

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.088.01
(Д 002.214.01) НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА ОБЩЕЙ
ГЕНЕТИКИ ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК**

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 29.09.2022 протокол № 33

О присуждении Малых Евгении Александровне, гражданке РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Генетическая модификация клеток *Escherichia coli* с целью обеспечения их аденозинтрифосфатом в условиях сверхсинтеза L-гистидина» по специальности 1.5.7. – генетика принята к защите «09» июня 2022 г., протокол № 21, диссертационным советом 24.1.088.01 (Д 002.214.01.) на базе федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН), 119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д. 3, приказ Минобрнауки РФ №105/нк от 11.04.2014.

Соискатель Малых Евгения Александровна, 1990 года рождения, в 2012 году окончила федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», ей присуждена квалификация «Инженер» по специальности «Биотехнология», специализация – «Экобиотехнология».

Диссертационная работа Малых Евгении Александровны выполнена в Акционерном Обществе «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ»), г. Москва.

В период подготовки диссертации и по настоящее время Малых Е.А. работает в должности научного сотрудника в АО «АГРИ».

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано 17 сентября 2020 года Федеральным государственным бюджетным учреждением «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», в котором Малых Е.А. обучалась для сдачи экзаменов кандидатского минимума в 2013-2014 гг.

Научный руководитель диссертационной работы – Стойнова Наталия Викторовна, кандидат биологических наук, доцент, директор по науке АО «АГРИ», научный консультант диссертационной работы – Лившиц Виталий Аркадьевич доктор биологических наук, профессор, научный консультант АО «АГРИ».

Официальные оппоненты:

- **Синеокий Сергей Павлович**, доктор биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика, профессор, руководитель Биоресурсного Центра «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» (БРЦ ВКПМ) Курчатовского комплекса генетических исследований Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", г. Москва.

- **Карпов Дмитрий Сергеевич**, кандидат биологических наук по специальности 1.5.3. – молекулярная биология, старший научный сотрудник лаборатории регуляции внутриклеточного протеолиза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), г. Москва

Официальные оппоненты дали положительные отзывы. Высказаны незначительные замечания, вопросы и комментарии, относящиеся скорее к оформлению работы, в частности, к редакционным недочетам. В большинстве своем, замечания носят рекомендательный характер, не

снижают значения представленных в диссертации результатов. Ответы на все замечания и комментарии представлены в стенограмме заседания.

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва, в своем положительном заключении, подписанным Гулевичем А.Ю., кандидатом химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия, руководителем группы метаболической инженерии бактерий Федерального государственного учреждения Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, указано, что диссертационная работа по своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, полноте описания и достоверности полученных результатов полностью соответствует всем требованиям ВАК Минобрнауки РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Диссертация является законченным научным исследованием, представляющим новые данные, ценные как для фундаментальной науки, так и для практики. Диссертация выполнена на высоком научном уровне. Выводы и заключения обоснованы. Диссертация в целом не вызывает серьезных замечаний. Замечания в основном редакционного характера. Ответ на отзыв представлен в стенограмме заседания.

Соискатель имеет 4 публикации по теме диссертации, из них 1 в рецензируемом научном журнале, 2 патента, 1 патентная заявка. Кроме того, результаты работы были представлены на трех международных конференциях.

Список публикаций, соответствующих Перечню ВАК и индексируемых в базе Web of Science/Scopus.

1. Malykh E. Specific features of l-histidine production by *Escherichia coli* concerned with feedback control of AICAR formation and inorganic phosphate/metal transport / E.A. Malykh, I.A. Butov, A.B Ravcheeva, A.A

- Krylov, S.V. Mashko, N.V. Stoynova // Microbial cell factories. – 2018. – Т.17 - №1 – С.1-15.
2. Stoynova N. Method for producing an L-amino acid using a bacterium of the family Enterobacteriaceae having attenuated expression of the yjK gene / N.V. Stoynova, V.V. Samsonov, N.S. Eremina, E.A. Polyakova (Malykh) // US9175319B2 (CN104120157B, JP6459203B2, EP2796560B1) – 2015.
 3. Kuvaeva T. Method for producing an L-amino acid using a bacterium of the family Enterobacteriaceae having attenuated expression of a phosphate transporter-encoding gene / T.M. Kuvaeva, E.A. Polyakova (Malykh), N.V. Stoynova // US9873898B2 (EP3052637B1, JP6460100B2) – 2018.
 4. Malykh E. Method for producing target substance by bacterial fermentation / E. Malykh, N. Stoynova, L. Golubeva, S. Mashko, E. Kovaleva, M. Shupletsov, M. Baboshin, A. Krylov, N. Zakataeva, E. Andrianova, M. Kharchenko, E. Voroshilova // WO2020071538A1 – 2020.

На автореферат диссертации отзывы прислали:

1. Минаева Наталья Игоревна – кандидат биологических наук по специальности 1.5.3. – молекулярная биология, Научный сотрудник лаборатории №4 Акционерного Общества «научно-исследовательского института Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ»), г. Москва. Отзыв положительный, без замечаний.
2. Лавров Константин Валерьевич – кандидат биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика, доцент Института нано-, био-, информационных, когнитивных и социогуманитарных наук и технологий (ИНБИКСТ) Московского физико-технического института (Национального исследовательского университета), г. Москва. Отзыв положительный. В качестве замечания было отмечено, что автор не пояснила, почему в качестве продуцента L-гистидина была выбрана именно *E. coli*, а не *Corynebacterium glutamicum*, широко используемая в промышленном получении аминокислот. Ответ на замечание представлен в стенограмме заседания.

3. Родина Елена Валерьевна – кандидат химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия, доцент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва. Отзыв положительный. с перечислением недостатков в тексте автореферата (всего 3).

1. Было отмечено, что в тексте автореферата (в т.ч. на Рис. 1, где показан путь биосинтеза L-гистидина) отсутствуют структурные формулы важнейших интермедиатов, о которых идет речь, например, АИКАР. В то же время, автор иногда апеллирует к структурам, например, ссылается на структурное сходство АИКАР и АМФ. Идеи автора было бы удобнее воспринимать, имея под рукой основные структурные формулы.

2. На Рис. 2 приведены кривые ингибирования HisG под действием АИКАР. Во-первых, приведенные данные не демонстрируют строго конкурентный характер ингибирования, здесь он скорее смешанный. Во-вторых, из этих данных также не очевиден вывод, сделанный в тексте: «...уровень ингибирования АИКАР выше, чем АМФ», поскольку сравниваемые рисунки отличаются одновременно несколькими параметрами - и концентрациями ингибиторов, и диапазоном концентраций субстрата АТФ, и степенью ингибирования при равной концентрации АТФ. Необходимо пояснить, что именно сравнивает автор на приведенных графиках.

3. «В рамках существующей модели регуляции *rho*-регулона... нами предложена гипотеза о механизме такого влияния». – Было отмечено, что, упомянув предложенную гипотезу в тексте автореферата, автору следовало бы не обрывать идею, а коротко, в одной фразе, написать, в чем же заключалась эта гипотеза. Ответы на все замечания представлены в стенограмме заседания.

Выбор официальных оппонентов определяется их большим опытом в области генетики и молекулярной биологии, а также наличием публикаций в ведущих рецензируемых изданиях по тематике работы.

Выбор ведущей организации обосновывается высоким уровнем проводимых в ней исследований в области фундаментальной и прикладной биотехнологии, а также высоким профессиональным уровнем сотрудников.

Диссертационный совет отмечает, что соискателем проведено масштабное исследование и поиск новых подходов к обеспечению клеток *Escherichia coli* аденозинтрифосфатом в условиях сверхпродукции L-гистидина, а также улучшение свойств штаммов – продуцентов L-гистидина, промышленно значимой аминокислоты.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что в процессе исследования впервые было показано, что у *E. coli* ферментативная активность ключевого фермента пути биосинтеза, АТФ-фосфорибозилтрансферазы (АТФ-ФРТ), подавляется побочным продуктом биосинтеза L-гистидина, АИКАР. Также были продемонстрированы данные, свидетельствующие о том, что АИКАР негативно влияет на индукцию *pho*-регулона. На основе полученных результатов, автором были сконструированы генно-инженерные штаммы, характеризующиеся сверхэкспрессией генов *purH* и *purA*, которые участвуют в превращении АИКАР в нуклеотиды аденина и повышают продукцию L-гистидина. Дополнительно, соискателем были обнаружены факторы, которые оказывают положительное влияние на продукцию L-гистидина, а именно, инактивация транспортера PitA и делеция трансляционного фактора EttA. Автором было показано, что умеренное увеличение в хромосоме *E. coli* числа копий оперонов (*atp* и *nuo*), кодирующих H⁺-АТФ-синтазу и NADH:убихинон-оксидоредуктазу I (NDH-1), соответственно, приводит к повышению скорости роста и накопления биомассы при культивировании клеток в условиях высокой аэрации. Было продемонстрировано, что известная мутация *nuoF*^{E183A}, придающая NDH-1 способность окислять как NADH, так и NADPH, повышает продукцию L-гистидина штаммом-продуцентом. Впервые была показана возможность замены в клетках *E. coli* гена цитоплазматической пирофосфатазы *ppa*, который является жизненно необходимым, на ген мембранной пирофосфатазы *hppa*^{Rru} из *R. rubrum*. Данная замена в штамме-продуценте L-гистидина приводила к увеличению накопления этой аминокислоты.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики:

Был проведен поиск и применение неочевидных подходов для конструирования штаммов-продуцентов *E. coli* L-гистидина в сочетании с использованием современных методов направленного редактирования генома. Полученные результаты важны для понимания регуляции синтеза L-гистидина в *E. coli*, а также для обеспечения клеток *E. coli* аденозинтрифосфатом в условиях сверхсинтеза этой аминокислоты. В работе были продемонстрированы такие генетические подходы, как использование мутантного комплекса NDH-1, способного окислять как NADH, так и NADPH, а также экспрессия в клетках *E. coli* гена мембранной пирофосфатазы *hppa*^{Rru} из *R. rubrum*, которая осуществляет реакцию гидролиза неорганического PP_i, сопряжённую с переносом протона H⁺ через мембрану против градиента концентраций и участвует в формировании протон-движущей силы, необходимой для регенерации/синтеза АТФ. Было продемонстрировано, что применение данных альтернативных подходов, наряду с другими, повышает продукцию L-гистидина штаммом-продуцентом. Данные подходы могут быть применены для конструирования промышленных штаммов-продуцентов L-гистидина, что поможет расширить возможности применения данной аминокислоты для пищевой промышленности, медицины и сельского хозяйства, а также снизить его себестоимость.

Оценка достоверности результатов исследования: результаты исследования получены с применением современных молекулярно-генетических методов и имеют комплексный характер. Все методы, использованные в исследовании, подробно описаны в работе. Результаты исследования представлены в виде 1 статьи в рецензируемом научном издании, 2 патентов и 1 патентной заявки. Промежуточные и итоговые результаты представлены на российских и международных конференциях.

Личный вклад соискателя заключается в выполнении большей части исследований. Автор принимал личное участие на всех этапах выполнения работы. Анализ образцов, содержащих АИКАР в исследуемых штаммах, проводился методом ВЭЖХ аналитической группой АО «АГРИ». Гибридизация по Саузерну

была проведена совместно с научным сотрудником АО «АГРИ» к.б.н. Горшковой Н.В.


Диссертация Малых Евгении Александровны «Генетическая модификация клеток *Escherichia coli* с целью обеспечения их аденозинтрифосфатом в условиях сверхсинтеза L-гистидина» полностью соответствует критериям, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 23 сентября 2013 года.


На заседании 29 сентября 2022 года диссертационный совет принял решение присудить Малых Евгении Александровне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 14 докторов наук по специальности 1.5.7. - генетика, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, проголосовали: за – 14 человек, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель
диссертационного совета

Ученый секретарь
диссертационного совета


Захаров-Гезехус И.А.


Горячева И.И.

«29» сентября 2022 года

Подписи Захарова-Гезехуса И.А. и Горячевой И.И. удостоверяю

Директор ИОГен РАН
Кудрявцев А.М.

