

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу **Закатаевой Наталии Павловны**
**«Применение стратегий метаболической инженерии для генетического
конструирования штаммов-продуцентов пуриновых производных на основе
Bacillus»,**

представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 1.5.7 – генетика

Актуальность темы выполненного исследования. Пуриновые соединения играют не только важную роль в физиологии клетки, но также являются биотехнологически значимыми продуктами. Пуриновые нуклеозиды инозин и гуанозин, а также акадезин и рибофлавин широко используются в качестве компонентов медицинских препаратов и пищевых добавок. Продукты фосфорилирования инозина и гуанозина, IMP и GMP, соответственно, являются известными усилителями вкуса и могут применяться для улучшения принятия диет с низким содержанием соли. Все эти соединения могут быть получены с помощью микробного синтеза. В качестве микробных клеточных фабрик используют штаммы-продуценты пуриновых соединений на основе *Bacillus*, *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*. Долгое время единственным инструментом для получения и улучшения свойств таких продуцентов была традиционная селекция. Однако ее возможности для создания штаммов с заданными свойствами и определенными биотехнологическими характеристиками весьма ограничены. Поэтому выбор, разработка и применение стратегий метаболической инженерии для рационального конструирования штаммов-продуцентов на основе *Bacillus* является очень актуальной задачей. Эта задача непростая, не только из-за сложностей с доставкой генетического материала в клетки этих бактерий, которые имеют мощную систему модификации-рестрикции, а также утратили способность развивать компетентность при генетической трансформации, но и по причине не полностью исследованного метаболизма этих грамположительных бактерий.

Решению этой актуальной комплексной задачи и посвящена диссертационная работа **Закатаевой Наталии Павловны** «Применение стратегий метаболической инженерии для генетического конструирования штаммов-продуцентов пуриновых производных на основе *Bacillus*».

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Экспериментальные данные, представленные в диссертационной работе **Закатаевой Н. П.**, получены с применением

современных молекулярно-генетических, биохимических, генетических, аналитических, микробиологических методов, а также методов биоинформатики, и приводятся автором с учетом статистической обработки. Достоверность результатов, как и обоснованность сделанных на их основе выводов, не вызывает сомнения. Результаты работы неоднократно были представлены на российских и международных съездах, симпозиумах и конференциях в виде докладов и стендовых сообщений.

Публикация результатов работы. Основные положения и результаты диссертационной работы Закатаевой Н. П. опубликованы в виде 13 научных статей в рецензируемых журналах из списка ВАК (в большинстве - из первого квартала), а также в виде 19 российских и международных патентов и заявок на изобретение.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. В результате исследований по теме диссертационной работы Закатаевой Н. П. был разработан метод для доставки генетического материала в клетки нетрансформируемых бацилл, а также создан удобный инструментарий для прецизионного редактирования геномов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*. Этот подход позволил получать различные рекомбинантные штаммы, в том числе, удовлетворяющие строгим правилам, предъявляемым к штаммам для производства пищевых добавок и медицинских препаратов (отсутствие в клетках маркеров устойчивости к антибиотикам, чужеродной ДНК, плазмид и т.д.). Автором были впервые получены и подробно охарактеризованы устойчивые к ретроингибированию мутантные формы PRPP-синтетазы из *B. amyloliquefaciens*; обнаружены три новых гена *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* (*yutF*, *yitU*, *yueE*) и биохимически охарактеризованы их продукты, осуществляющие дефосфорилирование пуриновых нуклеотидов у бацилл, подробно изучена регуляция транскрипции гена *yutF*. В процессе работы впервые у бактерий были найдены гены, участвующие в транспорте пуриновых нуклеозидов из клетки (экскреция или экспорт), *nepl* у *Escherichia coli* и *pbuE* у *Bacillus*. На основе этих и ряда других данных, представленных в диссертации, выявлены и применены стратегии для создания и усовершенствования штаммов-продуцентов пуриновых нуклеозидов, акадезина и рибофлавина, а именно, усиление экспрессии *pur*-оперона, использование устойчивых к ретроингибированию PRPP-синтетаз, усиление экспрессии генов 5'-нуклеотидаз и генов экскреции целевого продукта. Кроме того в ходе работы был предложен оригинальный метод, позволяющий с помощью селекции по устойчивости к пуриновым нуклеозидам в сконструированном с этой целью штамме *E. coli* искать в любом геноме как гены 5'-нуклеотидаз, так и гены экспорта пуриновых нуклеозидов.

Значимость полученных автором результатов для науки и практики. Полученные в работе знания о новых генах, их регуляции и биохимических свойствах их продуктов существенно дополнили фундаментальные представления о генетическом контроле и регуляции метаболизма грамположительных (*B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*) и грамотрицательных (*E. coli*) бактерий. В комбинации с разработанным удобным методом генно-инженерного конструирования штаммов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, включая и нетрансформируемые штаммы, эти знания заложили основу для получения эффективных продуцентов пуриновых соединений и рибофлавина. Многие из найденных подходов были применены автором и его коллегами на практике при создании реальных промышленных штаммов-продуцентов пуриновых нуклеозидов, которые были успешно внедрены в мировое биотехнологическое производство.

Результаты этого исследования могут быть полезны и при разработке стратегий создания ряда других штаммов-продуцентов как на основе *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и родственных организмов, так и на основе *E. coli*. Речь идет, например, о продуцентах флавиновых нуклеотидов или соединений, для которых метаболическим предшественником является PRPP. Предложенный в работе метод селекции по фенотипу может быть использован для поиска новых генов, кодирующих белки-экспортеры и 5'-нуклеотидазы, в библиотеках генов любых организмов.

Структура работы. Переходя к непосредственной оценке содержания диссертационной работы Закатаевой Н. П. хочу отметить, что она оформлена аккуратно, компактно и состоит из традиционных разделов: введения, обзора литературы (включающего 7 подразделов), описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов из работы, списка цитируемой литературы, списка работ, опубликованных по теме диссертации, списка сокращений и раздела благодарностей. В целом диссертация содержит 196 страниц и включает 68 рисунков и 26 таблиц. В списке цитирования содержится информация о 312 источниках, из которых 308 опубликованы на английском языке.

Как и положено, во введении дана общая характеристика диссертационной работы. В нем хорошо раскрыты актуальность темы и степень ее разработанности; научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы; цель и задачи исследования; четко сформулированы положения, выносимые на защиту; описаны личный вклад автора в исследование и детали апробации работы.

Обзор литературы позволяет глубже понять результаты исследований, он неплохо иллюстрирован, в нем отражены современные знания по всем основным направлениям исследований диссертации, а также обозначены существующие пробелы в знаниях, которые указывают на обоснованность и актуальность тематики диссертации. Обзор

содержит данные о значении бацилл для биотехнологического производства, описывает современные представления об успехах в области генной инженерии штаммов *Bacillus*, о генетическом контроле и регуляции биосинтеза и метаболизма пуриновых нуклеотидов и рибофлавина, а также систематизирует знания о 5'-нуклеотидазах и транспортерах, отвечающих за экскрецию метаболитов у бактерий.

В разделе «Материалы и методы исследования» Закатаевой Н. П. описаны разнообразные методы работы с ДНК, РНК, белками, микробиологические методы, а также методы статистического анализа, анализа последовательностей ДНК и белка *in silico* с указанием основных баз данных, использованных в работе. Этот материал указывает на общую хорошую методическую подготовку автора диссертации.

Глава «Результаты и обсуждение» содержит несколько тематических разделов. Это разделы, посвященные созданию генно-инженерного инструментария для рационального конструирования промышленно значимых штаммов *Bacillus* и поиску подходов для усиления биосинтеза и накопления пуриновых производных. Последний раздел включает в себя работы по снятию негативной регуляции экспрессии генов пуринового оперона, снятию ретроингибирования PRPP-синтетазы, усилению конверсии пуриновых нуклеотидов в нуклеозиды и усилению экскреции пуриновых нуклеозидов у *E. coli*, *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*. В данной главе подробно изложены результаты, полученные в ходе исследований, а также содержится их анализ и обсуждение.

В заключении кратко представлены наиболее значимые научные и практические результаты данной диссертационной работы. В следующем за ним разделе «Выводы» сформулировано 12 основных выводов из работы. Они полностью обоснованы, и их содержание соответствует полученным результатам.

Содержание автореферата отражает основные положения и выводы диссертации, а его оформление соответствует требованиям к авторефератам.

Замечание. Для нуклеотидазы YutU в работе выявлена роль в клеточном метаболизме – биосинтез рибофлавина и FAD и, по всей видимости, регуляция внутриклеточных пулов этих флавинов, в которой также участвуют белки – паралоги, YcsE и YwtE. Обнаружена также ключевая роль фермента в биосинтезе пуриновых нуклеозидов. Однако, для другого изученного фермента, продукта гена *yutF*, в диссертации четко не обозначено, какую функцию выполняет фермент.

Хочу подчеркнуть, что замечание имеет рекомендательный характер, и в целом не снижает общей высокой оценки работы.

Заключение. Рассматриваемая научно-исследовательская работа Закатаевой Н. П. является самостоятельной, завершенной научно-квалификационной работой, содержащей научные результаты и положения, которые расширяют наши представления о генетическом контроле метаболизма бактерий, а также имеют важное практическое значение для создания и улучшения промышленных продуцентов пуриновых нуклеозидов и производных пуринов.

Таким образом, диссертационная работа Закатаевой Наталии Павловны «Применение стратегий метаболической инженерии для генетического конструирования штаммов-продуцентов пуриновых производных на основе *Bacillus*» полностью отвечает требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Закатаева Наталия Павловна, заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика (согласно п. 1, 2, 8 и 11 Паспорта номенклатуры специальностей научных работников по данной специальности).

Официальный оппонент,
доктор биологических наук, доцент,
заведующая лабораторией молекулярной биологии
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
(ФГБНУ «МГНЦ»)

Костюк Светлана Викторовна _____

« 06 » октября 2022 г.

115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1,
+7 (499) 612-86-07, mgnc@med-gen.ru

Подпись Костюк С. В. заверяю,
Ученый секретарь ФГБНУ «МГНЦ»,
кандидат медицинских наук

Воронина Екатерина Сергеевна _____

