

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 исследования

Создание эффективных клеточных фабрик для производства различных продуктов, (химикатов, топлива, ферментов и т. д.) из возобновляемых ресурсов является актуальным для поступательного развития экономики. Такие виды бацилл, как *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* и др. являются грамположительными бактериями, обладающими рядом уникальных преимуществ в качестве хозяина для производства микробных ферментов и промышленно важных биохимических веществ, в частности пуриновых соединений, нуклеотидов и нуклеозидов, которые широко используются как в пищевой промышленности, так и в качестве медицинских препаратов. Однако до реализации представленной на защиту работы, методы для рационального конструирования штаммов-продуцентов на основе плохо трансформируемых штаммов *Bacillus* практически полностью отсутствовали из-за проблем с введением генетического материала в клетки этих бактерий. Получение же эффективных штаммов-продуцентов на основе только методов традиционной селекции, как известно, имеет целый ряд серьезных недостатков и ограничений. Диссертационная работа Закатаевой Н. П. посвящена актуальной тематике выбора, разработки и применения стратегий метаболической инженерии для рационального конструирования штаммов-продуцентов пуриновых нуклеозидов на основе штаммов *Bacillus*. В диссертационной работе также разрабатывались некоторые подходы для улучшения штаммов продуцентов акадезина (AICAr) и рибофлавина.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Важно отметить, что все научные положения и выводы диссертации Закатаевой Н. П. подкреплены большим массивом экспериментальных данных, которые были получены с использованием самих современных и разноплановых методов исследований, включая генетические, молекулярно-генетические, биохимические, микробиологические, аналитические и др. Часто, перед тем как сделать определенный вывод, автор приводит не одно, а сразу несколько независимых доказательств. Все приведенные экспериментальные данные обработаны с помощью принятых статистических методов, их достоверность не вызывает

сомнений. Рассматриваемая работа прошла апробацию на многочисленных российских и международных конференциях.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Представленные в диссертационной работе исследования позволили автору впервые получить целый ряд результатов, наиболее существенные из которых перечислены ниже:

- впервые разработан удобный и эффективный метод для генетического редактирования хромосом клеток штаммов *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis*, в том числе и утративших природную компетентность и способность к трансформации;
- получены мутации, позволяющие снять негативную регуляцию и повысить экспрессию генов пуринового оперона;
- изучены биохимические свойства PRPP-синтетазы из *B. amyloliquefaciens*, найдены и подробно охарактеризованы мутантные формы фермента, устойчивые к ретроингибированию;
- предложен оригинальный подход для поиска генов 5'-нуклеотидаз и генов транспорта пуриновых нуклеозидов из клеток бактерий с помощью селекции на устойчивость к пуриновым нуклеозидам в специально сконструированном штамме *E. coli*;
- найдены и охарактеризованы ранее неизвестные у *Bacillus* гены, кодирующие 5'-нуклеотидазы (*yutF*, *yitU*, *yueE*);
- у *E. coli*, *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* найдены и охарактеризованы ранее неизвестные у бактерий гены, кодирующие белки транспорта (экспорта) пуриновых нуклеозидов из клеток (*nepI*, *pbuE*);
- выявлен ряд ключевых факторов, позволяющих существенно повысить биосинтез и внеклеточное накопление целевых продуктов, а именно пуриновых нуклеозидов, а также рибофлавина и АІСAr, у соответствующих штаммов-продуцентов;
- впервые продемонстрирована перспективность использования амплификации гена 5'-нуклеотидазы *yitU* для повышения продукции пуриновых нуклеозидов, рибофлавина и АІСAr.

Все основные положения и результаты диссертационной работы Закатаевой Н. П. получены автором лично или под его непосредственным руководством и изложены в 13 статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, в 19 патентах и заявках на изобретение. Материалы диссертации были представлены на многочисленных российских и международных съездах, симпозиумах и конференциях.

Значимость полученных автором результатов для науки и практики

Полученные в работе Закатаевой Н. П. результаты имеют как научное, так и прикладное значение. В научном плане открытие ряда новых генов, изучение регуляции их экспрессии, биохимическая характеристика их продуктов существенно расширили знания о генетической

регуляции метаболизма грамположительных и грамотрицательных бактерий. Что касается практического применения, проведенные исследования заложили основы метаболической инженерии продуцентов на основе безопасных для человека *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, в частности, продуцентов пуриновых нуклеозидов, акадезина, а также рибофлавина. Важно, что разработанный автором работы метод для генно-инженерного редактирования геномов бацилл нашел свое применение в ряде научных лабораторий в России и за рубежом, а созданные с помощью найденных подходов промышленные штаммы-продуценты инозина и гуанозина на основе *B. amyloliquefaciens* успешно используются для получения этих соединений в мировом биотехнологическом производстве.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Закатаевой Н. П. построена по традиционному плану и включает главы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список цитируемой литературы», «Список работ, опубликованных по теме диссертации», «Список сокращений» и «Благодарности». Несмотря на большой объем изложенных результатов, работа написана лаконично и понятно на 196 страницах. Текст дополняют 68 рисунков и 26 таблиц, а список цитирования содержит 312 источников.

Во введении обрисована актуальность темы, определена научная новизна и практическая значимость работы, четко сформулированы цели и задачи исследования, положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы содержит подробный анализ современных знаний по теме диссертации, а также дает представление о научных проблемах в этой области, облегчая, таким образом, понимание ее результатов и объясняя причину постановки целей и задач работы. Обзор написан хорошим языком и неплохо иллюстрирован, а его содержание отражает полноту знаний автора диссертации о современных успехах науки в таких областях как современные генно-инженерные подходы к конструированию штаммов бацилл, регуляция биосинтеза и гидролиза пуриновых и флавиновых нуклеотидов, а также белках транспорта метаболитов из клеток. Приведенные в обзоре литературы данные хорошо структурированы и систематизированы. Так, в разделе, описывающем 5'-нуклеотидазы и их роль в метаболизме бактерий, обращает на себя внимание большая сводная таблица, подготовленная автором на основе детального анализа огромного массива данных литературы и хорошо систематизирующая знания об этих ферментах.

Раздел, описывающий материалы и методы исследования, включает подразделы о работе с ДНК, РНК, белками, применение аналитических методов, методов анализа *in silico* и т.д. и позволяет воспроизвести проведенные в ходе работы эксперименты, а также наглядно

демонстрирует владение автором широким спектром современных методов исследований.

Глава, посвященная собственно результатам и их обсуждению, разделена на две смысловые части. Первая часть посвящена созданию генетического инструментария для генно-инженерных модификаций хромосом промышленно важных штаммов бацилл, а вторая – изучению метаболизма этих бактерий, поиску и реализации стратегий метаболической инженерии для конструирования клеточных фабрик по производству пуриновых нуклеозидов. Помимо строго доказанных экспериментально выводов, этот раздел содержит также интересные предположения о физиологической роли найденных в ходе работы генов дефосфорилирования пуриновых нуклеотидов и генов экспорта пуриновых нуклеозидов, указывая на широкий научный кругозор автора.

Заключительная часть работы подводит итоги исследований, указывает на наиболее значимые результаты, полученные автором диссертации.

Выводы сформулированы четко в соответствии целями и задачами работы, отвечают положениям, выносимым на защиту, и их содержание полностью подтверждается экспериментальными данными.

Содержание автореферата полностью соответствует содержанию диссертации и отражает все основные положения и выводы.

В целом работа, как полученные результаты, так и их изложение, производят хорошее впечатление. Это логично выстроенное классическое исследование, выверенное от постановки цели и задач, проведенных экспериментов, их анализа и до сформулированных выводов.

Необходимо отметить также и **некоторые недостатки**, которые, впрочем, не снижают общей высокой оценки работы:

- В разделе 4.1.2, посвященном созданию метода редактирования геномов штаммов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, хорошо было бы указать, существуют ли у этого метода преимущества по сравнению с наиболее современными технологиями редактирования геномов, в частности, CRISPR/Cas технологиями.

- Эффект мутаций устойчивости к ретроингибированию в гене *prs* продемонстрирован в работе на примере повышения накопления пуриновых нуклеозидов. Автор работы утверждает, что это явилось результатом повышенного синтеза PRPP, который является важным предшественником в биосинтезе пуринов. Для получения прямых доказательств этого, хорошо было бы определить и сравнить пулы PRPP в клетках, содержащих *prs* дикого и мутантного типа.

Заключение

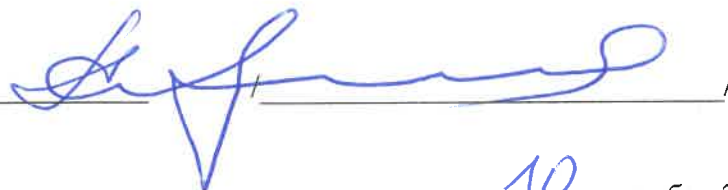
Учитывая актуальность, новизну, научную и практическую значимость работы, а также объем, достоверность и обоснованность полученных результатов, считаю, что рассматриваемая

диссертация Закатаевой Н. П. является завершенной научно-квалификационной работой, которая не только расширяет научные представления о генетическом контроле метаболизма нуклеотидов и нуклеозидов у бацилл, а также экскреции пуриновых соединений в клетках *E. coli*, *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, но и решает важную практическую задачу – создание основ для метаболической инженерии штаммов-продуцентов пуриновых нуклеозидов, а также совершенствования продуцентов рибофлавина и акадезина.

Таким образом, диссертационная работа Закатаевой Наталии Павловны «Применение стратегий метаболической инженерии для генетического конструирования штаммов-продуцентов пуриновых производных на основе *Bacillus*» полностью соответствует всем требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Официальный оппонент,
доктор химических наук, академик РАН,
научный руководитель направления «Биотехнология»
заведующий отделом Биотехнологии;
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков
М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ФГБУН ИБХ РАН)

Мирошников Анатолий Иванович



«10» октября 2022 г.

117997, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10,
+7 (495) 995-55-57 доб. 2005, aiv@ibch.ru

Подпись Мирошникова А. И. удостоверяю,

Ученый секретарь ИБХ РАН, доктор физико-математических наук,
Владимир Александрович Олейников

