

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

В диссертационной работе Закатаевой Наталии Павловны проведены исследования для решения масштабной задачи – выбора и реализации стратегий метаболической инженерии для создания высокоэффективных продуцентов пуриновых нуклеозидов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*. Эти представители грамположительных бактерий широко используются в биотехнологии, так как имеют ряд полезных характеристик. Они признаны безопасными для человека, имеют высокую скорость роста, обладают устойчивостью к неблагоприятным воздействиям и стрессовым факторам, хорошо растут на синтетических средах, обладают природной способностью к синтезу и накоплению целого ряда промышленно значимых метаболитов и экзоферментов. Одними из таких метаболитов являются пуриновые соединения (пуриновые нуклеозиды и нуклеотиды, акадезин или AICAr) и витамин рибофлавин, которые входят в состав пищевых добавок и различных лекарственных препаратов. Причем потребность в их производстве пуриновых соединений и рибофлавина методами микробного синтеза постоянно растет, требуя, соответственно, и улучшения биотехнологических свойств штаммов-продуцентов. Приблизительно до двухтысячных годов, то есть к началу исследований данной диссертационной работы, это достигалось в основном с помощью методов традиционной селекции, имеющих, как известно, ограниченный потенциал для этих целей. Кроме того, несмотря на секвенирование и аннотацию геномов *B. subtilis*, а позднее и *B. amyloliquefaciens*, у этих микроорганизмов оставались еще не до конца

изученными такие ключевые пути метаболизма, как путь биосинтеза флавиновых нуклеотидов и рибофлавина, неизвестен был генетический контроль деградации пуриновых нуклеотидов, а также в целом у бактерий не были известны гены, отвечающие за транспорт из клетки пуриновых нуклеозидов. Без ответа на эти и другие вопросы получение экономически оправданных клеток-фабрик на основе *Bacillus* было невозможно. Поэтому задачи, поставленные в данной диссертационной работе, являются важными, актуальными и комплексными.

Структура диссертации

Диссертационная работа Закатаевой Н. П. изложена на 196 страницах машинописного текста и содержит разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список цитируемой литературы», «Список работ, опубликованных по теме диссертации», «Список сокращений». Текст дополняют 68 рисунков и 26 таблиц. Библиографический указатель содержит 312 источников.

В разделе «Введение» обосновывается актуальность исследования; сформулированы цели и задачи работы; описывается предполагаемый автором подход к решению этих задач; представлены положения, выносимые на защиту; охарактеризована научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы; описаны личный вклад автора в исследования и апробация работы.

Раздел «Обзор литературы» состоит из семи основных частей, которые кратко, но емко знакомят с современными знаниями по всем темам, представленным в экспериментальной части диссертационной работы, а также подводят к обоснованию необходимости дальнейших исследований. В первой части описаны сферы применения пуриновых соединений в промышленности и медицине, показана роль и преимущества бацилл как объекта биотехнологического производства. Во второй части приведен обзор всех известных генно-инженерных методов получения штаммов *Bacillus*. Третья, четвертая и пятая части знакомят с путями биосинтеза пуриновых нуклеотидов и рибофлавина, включая регуляцию этих процессов в клетке. Шестая и седьмая

части обзора литературы систематизируют знания о 5'-нуклеотидазах и белках транспорта метаболитов из клеток бактерий (экскреция), соответственно. Причем в разделе об активном транспорте метаболитов из клеток цитируются не только публикации других авторов, но более ранние статьи и патенты Закатаевой Н. П., материал которых тесно связан, но не входит в исследования по теме диссертации. Этот факт свидетельствует о вкладе автора диссертации в исследование экскреции не только пуриновых нуклеозидов, но и других важных метаболитов, аминокислот.

Раздел «Материалы и методы исследования» достаточно подробно описывает молекулярно-генетические, биохимические, микробиологические методы, а также методы биоинформатики и статистического анализа, использованные в работе.

Раздел «Результаты и обсуждение» содержит результаты проведенных экспериментов и их анализ. Он включает два больших подраздела: первый посвящен разработке генно-инженерного инструментария для редактирования геномов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, а второй - поиску подходов для изменения генетической регуляции метаболизма бацилл с целью усиления биосинтеза и накопления пуриновых производных. В составе первой части приводятся данные по оптимизации условий доставки генетического материала в клетки бацилл, а также по разработке метода введения генетических модификаций в хромосому штаммов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* и модификации метода путем применения маркера контрселекции, усовершенствованного в ходе работы. Вторая часть раздела включает несколько подразделов: 1) усиление биосинтеза пуриновых нуклеотидов за счет снятия негативной регуляции экспрессии генов пуринового оперона и снятия ретроингибирования PRPP-синтетазы; 2) усиление конверсии пуриновых нуклеотидов в нуклеозиды и 3) усиление экскреции целевого продукта как важный фактор рационального дизайна продуцентов пуриновых нуклеозидов на основе *Escherichia coli* и штаммов *Bacillus*.

В разделах «Заключение» и «Выводы» подведены основные итоги работы и

кратко сформулировано 12 выводов.

Содержание автореферата отражает все основные положения и выводы диссертации.

Научная новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций. Степень обоснованности и достоверность сформулированных в диссертации научных положений

В диссертационной работе Закатаевой Н. П. был разработан инструментарий, который позволяет осуществлять редактирование геномов штаммов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, включая и природно нетрансформируемые штаммы, которые часто встречаются среди промышленно значимых видов бацилл. Этот метод оказался очень востребованным и нашел свое применение в различных лабораториях нашей страны и за рубежом, о чем свидетельствуют приведенные в диссертации ссылки на статьи.

Применение генной инженерии в исследованиях по теме диссертации позволило автору работы не только расширить знания о метаболизме и транспорте метаболитов у бацилл благодаря идентификации ряда новых генов, отвечающих за гидролиз нуклеотидов (*yutF*, *yitU* и *yueE* у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*) и транспорт пуриновых нуклеозидов из клеток (*nepl* у *E. coli* и *pbuE* у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*), но и выявить ключевые факторы, позволяющие улучшить биосинтез и экскрецию целевого продукта у продуцентов инозина и гуанозина, а также рибофлавина и AICAr на основе бацилл. В качестве таких факторов были выявлены мутации, усиливающие экспрессию генов биосинтеза пуриновых нуклеотидов *de novo*; мутации устойчивые к ретроингибированию в PRPP-синтетазе из *B. amyloliquefaciens*; а также сверхэкспрессия генов *yitU*, *nepl* и *pbuE*. Применение этих подходов продемонстрировано в работе на примере модельных продуцентов, однако они также использовались в группе, возглавляемой Закатаевой Н. П., для создания современных конкурентноспособных штаммов для биотехнологической промышленности.

Достоверность приведенных в диссертации результатов, полученных с применением самых современных методов исследования, а также обоснованность сделанных на их основе выводов, не вызывает сомнения. Работа была апробирована на ряде российских и международных съездах, симпозиумах и конференциях, где ее результаты были представлены в виде докладов и стендовых сообщений.

Публикация результатов работы

Основные положения и результаты диссертационной работы Закатаевой Н. П. опубликованы в рецензируемых журналах из списка ВАК (13 научных статей), а также защищены российскими и международными патентами и заявками на изобретение (19 патентов и заявок).

Значимость полученных автором результатов для науки и практики

Исследования, выводы и положения, представленные в диссертационной работе Закатаевой Н. П., приносят информацию о функциях генов и их продуктов, расширяя, таким образом, научные знания о генетической регуляции метаболизма и транспорте метаболитов у грамположительных (*B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*) и грамотрицательных (*E. coli*) бактерий. Предложенный в работе способ селекции генов, кодирующих 5'-нуклеотидазы и белки экскреции пуриновых нуклеозидов, может быть применен и на других объектах исследования.

Не менее важным является и практическое значение работы Закатаевой Н. П., в которой были созданы основы для метаболической инженерии продуцентов пуриновых нуклеозидов, а также совершенствования продуцентов рибофлавина и АICAr. Возможность применения усиления экспрессии генов экскреции пуриновых нуклеотидов в неродственных бактериях, где, как показано в диссертации, они сохраняют свои функции, расширяют горизонты использования сверхэкспрессии *perI* и *rbsU* для производства пуринов.

Замечания к работе

Существенных замечаний к работе нет, имеется лишь несколько пожеланий.

В литературном обзоре не хватает описания расчетных методов для предсказания метаболических потоков как необходимой составляющей метаболической инженерии.

В таблице 5, посвященной универсальности метода электропорации разработанного автором, не приведены данные о трансформации *B. subtilis*, хотя в тексте обсуждается, что на *B. subtilis* можно получить более высокие значения.

Приведенные замечания не снижают уровня и значимости рассматриваемой диссертационной работы.

Заключение

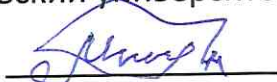
Научно-исследовательская работа Закатаевой Н. П. является самостоятельной, завершённой научно-квалификационной работой, в которой решены очень актуальные задачи – создание основ для метаболической инженерии штаммов-продуцентов пуриновых нуклеозидов, а также совершенствование продуцентов рибофлавина и акадезина. Помимо практического аспекта, который уже нашел свое воплощение в промышленных штаммах на производстве, работа обогатила современную науку новыми знаниями, наиболее важными из которых являются знания о генетическом контроле синтеза рибофлавина и FMN, регуляции процесса гидролиза нуклеотидов с участием 5'-нуклеотидаз у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, а также знания о генах и их продуктах, осуществляющих транспорт пуриновых соединений из клеток *E. coli*, *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*.

Итак, 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.

Официальный оппонент,
доктор биологических наук,
заведующий лабораторией молекулярной генетики,
заместитель заведующего кафедры биофизики;
Федерального государственного автономного образовательного
учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)»

Манухов Илья Владимирович



(подпись)

1 Манухов И.В.

(расшифровка подписи)

« 04. » 10 2022 г.

Адрес: 141700, Московская обл., г. Долгопрудный, ул. Первомайская, д. 3,
Корпус прикладной математики, 204.

Тел: моб. +7(905)562-29-24; +7 (495) 408–45–54

E-mail: manukhovi@mail.ru; info@mipy.ru

www.mipt.ru

Подпись доктора биологических наук,
главного научного сотрудника,
заведующего лабораторией молекулярной генетики

Манухова Ильи Владимировича удостоверяю:

Учёный секретарь МФТИ



 Евсеев Евгений Григорьевич