



федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии
и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

(ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)

123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

Тел: 8 499-193-30-01
Факс: 8 499-193-61-83

_____ № _____

На № _____ от _____

<http://www.gamaleya.org>
E-mail: info@gamaleya.org

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»

Академик, доктор биол. Наук, профессор

Гинцбург А.Л.

21.10.2022.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о диссертационной работе Закатаевой Наталии Павловны
«Применение стратегий метаболической инженерии для
генетического конструирования штаммов – продуцентов
пуриновых производных на основе *BACILLUS*», представленной к
защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по
специальности 1.5.7 – «генетика».

Актуальность темы диссертационной работы. Достигнутый в последние десятилетия стремительный прогресс биотехнологии, в области микробиологического производства промышленных ферментов, сделал бациллы одним из наиболее значимых для человека объектов живой природы, поставив их в один ряд с сельскохозяйственными животными и растениями, пекарскими дрожжами, мицелиальными грибами и актиномицетами. Долгое

время штаммы-продуценты на основе бацилл получали и улучшали с помощью мутагенеза и традиционной селекции с использованием скрининга на средах, содержащих токсичные аналоги метаболитов. Однако этот подход способствовал накоплению в хромосоме нежелательных мутаций, негативно влияющих на скорость роста и другие биотехнологические характеристики штаммов, а, главное, не позволял получать направленные изменения метаболических потоков, а значит создавать высокоэффективные продуценты с заданными свойствами.

Решить эту задачу позволяют современные методы метаболической инженерии. Метаболическая инженерия – это улучшение клеточной активности (например, усиление синтеза целевого продукта) путем изменения ферментативных, транспортных и регуляторных функций клетки с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Этот подход стал возможен благодаря бурному развитию молекулярно-генетических методов и основывается на изучении геномов, анализе метаболических потоков, транскрипционном анализе, изучении белковых продуктов клетки и требует совершенствования технологий для введения генно-инженерных модификаций.

Представленная Н.П.Закатаевой работа была выполнена в лаборатории АО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика», который является научным подразделением фирмы Ajinomoto Co., Inc. Одно из направлений исследований лаборатории – получение и совершенствование штаммов-продуцентов инозина и гуанозина на основе бактерий рода *Bacillus* для промышленных производств. Работа посвящена разработке новых подходов к конструированию высокоэффективных продуцентов пуриновых производных, в частности пуриновых нуклеозидов на основе штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*. Пуриновые нуклеотиды играют важную роль в физиологии клетки, участвуя в таких ключевых процессах, как синтез нуклеиновых кислот, макроэргов, кофакторов, витаминов и аминокислот. Инозинмонофосфат (ИМФ) и гуанозинмонофосфат (ГМФ), а также другие пуриновые соединения используют в пищевой промышленности и медицине в качестве пищевых добавок и лекарственных препаратов, соответственно. Другие пурины, например, инозин, гуанозин и 5-амино-4-имидазолкарбоксамид 2'-рибонуклеозид (АИСаг) положительно воздействуют на важные клеточные функции и применяются для лечения метаболического синдрома, лечения ожирения и резистентности к инсулину, профилактики диабета 2 типа, специфической индукции апоптоза в В-клетках; ослабления ишемии, ингибирования пролиферации раковых клеток, а также в качестве антиоксидантов и нейромедиаторов. Некоторые производные нуклеозидов используют в качестве сильнодействующих противовирусных препаратов и химиотерапевтических агентов. Метаболическое производное гуанозинтрифосфата (ГТФ), рибофлавин или

витамин В2, не синтезируется в клетках человека и животных и является необходимым элементом питания, а также используется в качестве медицинского препарата для восстановления двигательных функций пациентов с болезнью Паркинсона и лечения лактоацидоза. Потребность в промышленном производстве пуринов постоянно растет. Поэтому, исследование Закатаевой Н.П., посвященное новым, высокотехнологичным способам получения продуцентов пуриновых соединений с повышенным накоплением и выходом целевого продукта в ферментации на глюкозо-содержащем сырье, является без сомнения актуальным и имеет большое теоретическое и, особенно, практическое значение. Это подтверждается 19-ю патентами и заявками на изобретения, полученными соискателем с соавторами, начиная с 2004 по 2020 годы.

Структура и содержание диссертационной работы.

Диссертационная работа построена по традиционному плану и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список цитируемой литературы», «Список работ, опубликованных по теме диссертации», «Список сокращений», «Благодарности». Работа изложена на 196 страницах, включает 68 рисунков и 26 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 312 источников.

По теме диссертации опубликовано 13 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 19 международных и российских патентов и заявок на изобретение, 10 тезисов докладов, представленных на конференциях различного уровня.

Диссертационная работа Закатаевой Н.П. как по содержанию, так и по форме представляет собой современное молекулярно-генетическое исследование, посвященное созданию генно-инженерного инструментария для конструирования промышленно значимых штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*, включающее создание генно-инженерного инструментария для рационального конструирования промышленно значимых штаммов *Bacillus*, клонирования и гетерологичной экспрессии дикого и мутантных генов, выделение, очистку и изучение биохимических свойств продуктов клонированных генов, а также поиск и изучение генов, участвующих в экскреции пуринов у *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens* для улучшения производственных нужд.

Во «Введении» четко сформулированы цель и задачи исследования.

В «Обзоре литературы», изложенном на 50 страницах и состоящем из 7 подразделов дана полная современная характеристика объектов исследования – двух видов бацилл, использующихся как классические

фабрики для производства различных соединений, полученных как методом селекции, так и современными подходами к генетическому конструированию, основанные на молекулярно-генетических знаниях последнего времени. Описан генетический контроль и механизмы регуляции метаболизма пуриновых нуклеотидов у бацилл. Список цитируемой литературы, насчитывающий 312 источников, состоит в основном из работ 2000-2021 годов и представляет библиографический интерес для специалистов. Каждый из 7 разделов обзора заканчивается заключением, суммирующим то, что было сделано по данному разделу по данным литературы и то, что необходимо сделать и будет сделано в данной диссертационной работе. Это очень помогает читателю и рецензенту сориентироваться в этой важной и сложной проблеме.

В главе «Материалы и методы», представленной на 18 страницах очень подробно изложены методы, с помощью которых автор достигал поставленные цели. Можно сказать, что работа технологически насыщена современными сложными молекулярно-генетическими и биохимическими методами. В работе использован огромный арсенал сложнейших современных молекулярных методов, включая манипуляции с ДНК, РНК, белками. Только список векторов и праймеров, использованных автором занимает, соответственно, 4 и 3 страницы через 1 интервал. И больше половины использованных в работе плазмидных векторов получены автором данной диссертационной работы. Достоверность полученных автором результатов и «Выводов» не вызывает сомнений.

Новизна и практическая значимость работы.

Новизна представленной диссертации не вызывает сомнений, что подтверждается публикациями автора в престижных англоязычных журналах и 19-ю патентами на изобретения, полученными начиная с 2004 года до настоящего времени. Разработанный в ходе этого исследования надежный метод введения направленных немаркированных модификаций хромосомы клеток *B. amyloliquefaciens* и родственных бацилл был применен автором и его коллегами в АО «АГРИ» при конструировании различных штаммов-продуцентов на основе этих бактерий. Этот метод также активно используется в ряде отечественных и зарубежных лабораторий для изучения метаболизма и создания различных продуцентов на основе штаммов бацилл, о чем свидетельствуют многочисленные отечественные и международные публикации. Очень наглядно это продемонстрировано автором в отдельном списке статей других авторов, где цитируются и используются данные, полученные Закатаевой Н.П. с соавторами.

В ходе исследования были выявлены и применены ключевые подходы к созданию эффективных продуцентов пуриновых нуклеозидов. Они включают 1) усиление биосинтеза пуринов *de novo* путем снятия негативной регуляции конечными продуктами этого пути как на уровне транскрипции генов пуринового оперона, так и на уровне активности фермента фосфорибозилпирофосфатсинтетазы (PRPP-синтетазы), который катализирует образование непосредственного предшественника биосинтеза пуриновых нуклеотидов; 2) усиление процесса конверсии нуклеотидов в нуклеозиды, а также 3) активация транспорта (эффлюкса) нуклеозидов из клетки. Были исследованы *in silico* и затем экспериментально получены перспективные для биотехнологии мутации, приводящие к свехэкспрессии генов биосинтеза пуринов. Показано, что увеличение уровня экспрессии найденных генов 5'-нуклеотидаз позволяет усилить дефосфорилирование не только пуриновых нуклеотидов, но и некоторых их метаболических предшественников, повышая таким образом продукцию биотехнологически важных метаболитов, пуриновых нуклеозидов, АИСаг и рибофлавина. В ходе выполнения настоящей работы найдены и охарактеризованы несколько новых генов *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *E. coli* и впервые изучены биохимические свойства их продуктов – белков дефосфорилирования нуклеотидов и эффлюкса нуклеозидов, что позволило предсказать их физиологическую функцию в клетках. В ходе работы впервые изучена регуляция экспрессии генов, кодирующих 5'-нуклеотидазу YutF и белок эффлюкса NepI. Что расширяет современные знания о генетическом контроле и регуляции метаболизма у бактерий.

Сконструированные с применением найденных подходов метаболической инженерии промышленные штаммы-продуценты инозина и гуанозина на основе *B. amyloliquefaciens* используются Ajinomoto Co., Inc. для коммерческого производства этих соединений, обеспечивая высокую конкурентоспособность применяемой технологии. Таким образом, представленные в работе данные имеют как теоретическую, так и практическую значимость.

Есть только один вопрос к соискателю – что являлось предметом сравнения при патентовании полученных высоко эффективных штаммов-продуцентов?

Заключение.

Диссертационная работа Закатаевой Н.П. как по содержанию, так и по форме представляет собой законченное молекулярно-генетическое исследование, выполненное на высочайшем современном методическом уровне и имеющем и теоретическое и практическое значение.

Выводы полностью отражают полученные результаты, автореферат полностью отражает содержание работы. Все экспериментальные разделы диссертации полностью опубликованы в рецензируемых изданиях и представлены на конференциях различного уровня. Материалы диссертации соответствуют специальности 1.5.7 – генетика.

Фундаментальное исследование Закатаевой Н.П. по своей актуальности, объему и системному представлению полученных результатов соответствует всем требованиям ВАК п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24.09.2013 №842, а автор безусловно заслуживает присвоения ей ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Отзыв обсужден и утвержден на совместной конференции отделов Генетики и Молекулярной Биологии, Медицинской Микробиологии и отдела Бактериальных Инфекций ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» 20 октября 2022 года, протокол №3/22. Отзыв составлен доктором биологических наук, профессором, ведущим научным сотрудником ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи», зам. главного редактора журнала «Молекулярная генетика, микробиология и вирусология» Романовой Ю.М.

**Ведущий научный сотрудник
Отдела Генетики и Молекулярной Биологии
ФГБУ Научный Исследовательский Центр
эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ
доктор биологических наук, профессор**


/Романова Ю.М./

Подпись Романовой Ю.М. заверяю:
Ученый секретарь
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи», кбн. Кожевникова Л.К.



21.10.2022

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии
и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Адрес: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18
Телефон: 8 499-193-30-01
Эл. почта: info@gamaleya.org