

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

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 24.11.2022 протокол № 39

О присуждении Закатаевой Наталии Павловне, гражданке Российской Федерации, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Применение стратегий метаболической инженерии для генетического конструирования штаммов-продуцентов пуриновых производных на основе *Bacillus*» по специальности 1.5.7 генетика принята к защите 25.08.2022, протокол № 25, 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 Российской Федерации № 105/нк от 11.04.2012.

Соискатель Закатаева Наталия Павловна, гражданка РФ, 1962 года рождения, в 1985 году с отличием окончила Московский Химико-технологический институт им. Д. И. Менделеева, топливно-органический факультет, по специальности технология микробиологических производств с присуждением квалификации «инженер-технолог».

В 1985 году поступила на работу в Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов «ГосНИИгенетика». Будучи сотрудником «ГосНИИгенетика», выполнила и в 1997 году защитила кандидатскую

диссертацию «Исследование плейотропной мутации устойчивости к гомосерину и треонину у *Escherichia coli* K-12» с присвоением ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика. С 1998 года Закатаева Н. П. является научным сотрудником лаборатории №2 АО (ранее ЗАО) «Научно-исследовательский Институт Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ»). В 2008 году Закатаевой Н. П. присвоено звание доцента по специальности 1.5.7 – генетика.

Докторская диссертация «Применение стратегий метаболической инженерии для генетического конструирования штаммов-продуцентов пуриновых производных на основе *Bacillus*» выполнена в лаборатории АО «АГРИ».

В период подготовки диссертации с 2000 по 2022 год Закатаева Наталия Павловна работала в АО «АГРИ» сначала в должности научного сотрудника с 2000 по 2006 год, затем с 2006 в должности старшего научного сотрудника, а с 2012 года по настоящее время в должности заведующего лабораторией. С 2019 года и по настоящее время она также является заместителем директора по научной работе.

Научный консультант – доктор биологических наук (по специальности 1.5.7 – генетика), профессор Лившиц Виталий Аркадьевич, Профессор Геномного Центра "Развитие генетических технологий для промышленной микробиологии" Курчатовского комплекса генетических исследований (ГосНИИГенетика) Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва.

Официальные оппоненты:

1. Мирошников Анатолий Иванович, доктор химических наук (специальность 1.5.4 – биохимия), академик РАН, научный руководитель направления «Биотехнология», заведующий отделом Биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт

биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова» Российской академии наук, г. Москва;

2. Манухов Илья Владимирович, доктор биологических наук (специальность 1.5.7 – генетика), заведующий лабораторией молекулярной генетики, заместитель заведующего кафедры биофизики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», г. Москва;

3. Костюк Светлана Викторовна, доктор биологических наук (специальность 1.5.7 – генетика), доцент, заведующая лабораторией молекулярной биологии, Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», г. Москва.

Официальные оппоненты дали положительные отзывы. Высказаны замечания и комментарии. Замечания носят рекомендательный и дискуссионный характер, не снижают значения представленных в диссертации результатов. Ответы на все замечания и комментарии представлены в стенограмме заседания.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» (НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи), г. Москва, в своем положительном заключении, составленном Романовой Юлией Михайловной, доктором биологических наук, профессором, ведущим научным сотрудником НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи, заместителем главного редактора журнала «Молекулярная генетика, микробиология и вирусология», указано, что 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 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. Отзыв не содержит критических замечаний, в нем имеется один вопрос к диссертанту. Ответ на отзыв присутствует в стенограмме заседания.

Соискатель опубликовала 42 печатные работы в международных и отечественных изданиях, в том числе 13 статей в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК и/или БД РИНЦ, Scopus, Web of Science; 19 международных и российских патентов и заявок на изобретение; 10 публикаций являются статьями в сборниках трудов конференций, тезисами докладов, представленных на российских и международных съездах, конференциях, симпозиумах. В опубликованных работах полностью изложен материал диссертации. Научные результаты, описанные в диссертационной работе, получены соискателем лично или под ее непосредственным руководством (планирование экспериментов, анализ и обсуждение результатов, подготовка, написание и редактирование статей и патентных заявок) в соавторстве с сотрудниками АО «АГРИ», фамилии которых представлены в соответствующих публикациях. Авторский вклад Закатаевой Н. П. в публикациях, представленных в списке, является важнейшим и определяющим. Наиболее значительными являются следующие публикации:

1. **Zakataeva N.P.** (2021). Microbial 5'-nucleotidases: their characteristics, roles in cellular metabolism, and possible practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 105(20):7661-81.
2. Yusupova Y.R., Skripnikova V.S., Kivero A.D., **Zakataeva N.P.** (2020). Expression and purification of the 5'-nucleotidase YitU from *Bacillus* species: its enzymatic properties and possible applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 104(7):2957-72.
3. Kharchenko M.S., Teslya P.N., Babaeva M.N., **Zakataeva N.P.** (2018). Improving the selection efficiency of the counter-selection marker *pheS** for the

genetic engineering of *Bacillus amyloliquefaciens*. J Microbiol Methods. 148:18-21.

4. **Zakataeva N.P.**, Romanenkov D.V., Yusupova Y.R., Skripnikova V.S., Asahara T., Gronskiy S.V. (2016). Identification, Heterologous Expression, and Functional Characterization of *Bacillus subtilis* YutF, a HAD Superfamily 5'-Nucleotidase with Broad Substrate Specificity. PLoS One. 11(12):e0167580.

5. **Закатаева Н.П.**, Юсупова Ю.Р., Романенков Д.В., Лившиц В.А. (2013). Современные методы генетического конструирования промышленных штаммов на основе бактерий рода *Bacillus*. Биотехнология. 5:8-23.

6. **Zakataeva N.P.**, Romanenkov D.V., Skripnikova V.S., Vitushkina M.V., Livshits V.A., Kivero A.D., Novikova A.E. (2012). Wild-type and feedback-resistant phosphoribosyl pyrophosphate synthetases from *Bacillus amyloliquefaciens*: purification, characterization, and application to increase purine nucleoside production. Appl Microbiol Biotechnol. 93(5):2023-33.

7. Sheremet A.S., Gronskiy S.V., Akhmadyshin R.A., Novikova A.E., Livshits V.A., Shakulov R.S., **Zakataeva N.P.** (2011). Enhancement of extracellular purine nucleoside accumulation by *Bacillus* strains through genetic modifications of genes involved in nucleoside export. J Ind Microbiol Biotechnol. 38(1):65-70.

8. Гронский С.В., Романенков Д.В., **Закатаева Н.П.**, Асахара Т. (2011). Способ получения пуриновых рибонуклеозидов и рибонуклеотидов. Патент РФ RU2422510.

9. Asahara T., Mori Y., **Zakataeva N.P.**, Livshits V.A., Yoshida K., Matsuno K. (2010). Accumulation of gene-targeted *Bacillus subtilis* mutations that enhance fermentative inosine production. Appl Microbiol Biotechnol. 87(6):2195-207.

10. **Закатаева Н.П.**, Лившиц В.А., Мацуно К., Романенков Д.В., Витушкина М.В., Гронский С.В., Кутукова Е.А. (2010). Мутантная фосфорибозил-пирофосфатсинтетаза, ДНК, кодирующая ее, бактерия, содержащая указанную ДНК, способ продукции пуриновых нуклеозидов и способ продукции пуриновых нуклеотидов. Патент РФ RU2403286.

11. **Zakataeva N.P.**, Nikitina O.V., Gronskiy S.V., Romanenkov D.V., Livshits V.A. (2010). A simple method to introduce marker-free genetic modifications into the chromosome of naturally nontransformable *Bacillus amyloliquefaciens* strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85(4):1201-9.
12. Gronskiy S.V., Romanenkov D.V., **Zakataeva N.P.**, Asahara T. (2010). A method for producing purine ribonucleosides and ribonucleotides. WO201038903.
13. Kutukova E.K., **Zakataeva N.P.**, Livshits V.A. (2009). A method for producing purine nucleosides and nucleotides by fermentation using a bacterium belonging to the genus *Escherichia* or *Bacillus* EP2097512A1.
14. **Zakataeva N.P.**, Gronskiy S.V., Sheremet A.S., Kutukova E.A., Novikova A.E., Livshits V.A. (2007). A new function for the *Bacillus* PbuE purine base efflux pump: efflux of purine nucleosides. *Res Microbiol.* 158(8-9):659-65.
15. **Закатаева Н.П.**, Лившиц В.А., Гронский С.В., Кутукова Е.А., Новикова Е.А., Козлов Ю.И. (2007). Белок YdhL из *Bacillus amyloliquefaciens*, фрагмент ДНК, бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia* или *Bacillus*, – продуцент пуриновых нуклеозидов, способ получения пуриновых нуклеозидов и нуклеотидов. Патент РФ RU2294962.
16. **Закатаева Н.П.**, Кутукова Е.А., Гронский С.В., Трошин П.В., Лившиц В.А., Алёшин В.В. (2006). Экспорт метаболитов белками семейств DMT и RhtB и их возможная роль в межклеточной коммуникации. *Микробиология.* 75(4):509.
17. **Закатаева Н.П.**, Гронский С.В., Витушкина М.В., Лившиц В.А. (2006). Способ получения инозина и 5'-инозиновой кислоты методом ферментации с использованием бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*. Патент РФ RU2271391.
18. Gronskiy S.V., **Zakataeva N.P.**, Vitushkina M.V., Ptitsyn L.R., Altman I.B., Novikova A.E., Livshits V.A. (2005). The *yicM (nepI)* gene of *Escherichia coli* encodes a major facilitator superfamily protein involved in efflux of purine ribonucleosides. *FEMS Microbiol Lett.* 250(1):39-47.

19. Kutukova E.A., Livshits V.A., Altman I.P., Ptitsyn L.R., Ziyatdinov M.H., Tokmakova I.L., **Zakataeva N.P.** (2005). The *yeaS* (*leuE*) gene of *Escherichia coli* encodes an exporter of leucine, and the Lrp protein regulates its expression. FEBS Lett. 579(21):4629-34.

20. **Закатаева Н.П.**, Лившиц В.А., Гронский С.В. (2005). Способ получения инозина и 5'-инозиновой кислоты, штамм *Escherichia coli* - продуцент инозина. Патент РФ RU2244003.

На автореферат диссертации отзывы прислали:

1. Машко Сергей Владимирович – доктор биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология, Советник по Науке АО «АГРИ», профессор кафедры синтетическая биология биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ имени М.В. Ломоносова). Отзыв положительный, без замечаний.

2. Складнев Дмитрий Анатольевич – доктор биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология, профессор, главный научный сотрудник лаборатории выживаемости микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Отзыв положительный, без замечаний. В отзыве имеется пожелание автору диссертации написать обзорную статью по истории исследований нуклеинового биосинтеза и обмена.

3. Полуэктова Елена Ульриховна – доктор биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика, главный научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук. Отзыв положительный, без замечаний.

4. Лунин Владимир Глебович – доктор биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика, руководитель лаборатории биологически

активных наноструктур Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Отзыв положительный, без замечаний.

5. Миронов Андрей Александрович – доктор медицинских наук, профессор по специальности 1.5.3 – молекулярная биология, профессор факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова. Отзыв положительный, содержит два замечания. Ответы на замечания присутствуют в стенограмме заседания.

6. Алёшин Владимир Вениаминович – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела эволюционной биохимии Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова. Отзыв положительный, без замечаний.

Выбор официальных оппонентов определяется их большим опытом в области генетики бактерий, геной инженерии и биотехнологии, а также наличием публикаций в ведущих рецензируемых изданиях по тематике работы. Выбор ведущей организации обосновывается высоким уровнем проводимых в ней исследований в области генетики и геной инженерии, а также высоким профессиональным уровнем сотрудников.

Диссертационный совет отмечает, что работа выполнена на актуальную тему, посвящена разработке методологии метаболической инженерии для промышленно важных видов бацилл – *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*, и включает создание удобного гено-инженерного инструментария для редактирования геномов этих бактерий, изучение генетического контроля и регуляции метаболизма и транспорта пуриновых соединений, а также применение результатов исследования для улучшения свойств продуцентов пуриновых производных.

Научная новизна исследования заключается в том, что впервые разработан простой, быстрый и надежный метод введения направленных

модификаций хромосомы клеток *B. amyloliquefaciens* и родственных бацилл, включая утративших природную компетентность. 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); 2) усиление процесса конверсии нуклеотидов в нуклеозиды, а также 3) активацию транспорта (эфлюкса) нуклеозидов из клетки.

Впервые у бацилл были получены мутации, приводящие к свехэкспрессии генов биосинтеза пуринов и снятию ингибирования PRPP-синтетазы, показана их перспективность для биотехнологии. В ходе исследований найдены и охарактеризованы несколько новых генов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* (*yutF*, *yueE*, *yitU* и *pbuE* (*ydhL*)), а также *E. coli* (*nepI*). Впервые изучены биохимические свойства и функции их продуктов – белков дефосфорилирования нуклеотидов (YutF, YueE и YitU) и эфлюкса нуклеозидов (NepI и PbuE). В ходе работы впервые исследована регуляция экспрессии генов, кодирующих 5'-нуклеотидазу YutF и белок эффлюкса NepI. Продемонстрировано, что увеличение уровня экспрессии гена 5'-нуклеотидазы *yitU* позволяет усилить дефосфорилирование не только пуриновых нуклеотидов, но и некоторых их метаболитических предшественников, повышая таким образом продукцию пуриновых нуклеозидов, АИСаг и рибофлавина. Обнаружен положительный эффект повышения экспрессии генов экскреции пуриновых нуклеозидов, *nepI* и *pbuE*, на внеклеточное накопление этих метаболитов. Таким образом, полученные данные расширяют представления о генетическом контроле и регуляции метаболизма бактерий, а также создают основы для метаболической инженерии продуцентов пуриновых нуклеозидов, рибофлавина и АИСаг.

Значение полученных соискателем результатов для практики заключается в том, что разработанный генно-инженерный метод позволяет осуществлять направленное редактирование геномов *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*. Данный метод нашел свое применение в ряде отечественных и зарубежных лабораторий для изучения метаболизма и создания различных продуцентов на основе штаммов бацилл, о чем свидетельствуют приведенные в работе публикации.

Большое практическое значение имеют результаты работы, демонстрирующие, что сверхэкспрессию генов экскреции пуриновых нуклеозидов *yicM* и *pbuE*, а также гена 5'-нуклеотидазы *yitU* можно успешно использовать для увеличения накопления пуриновых нуклеозидов штаммами промышленно значимых бацилл. Промышленные штаммы-продуценты инозина и гуанозина на основе *B. amyloliquefaciens*, сконструированные с применением выбранных и разработанных в диссертации стратегий метаболической инженерии, используются для коммерческого производства этих соединений, обеспечивая высокую конкурентоспособность применяемой технологии. Разработанные подходы защищены российскими и международными патентами и патентными заявками.

Оценка достоверности результатов исследований: обоснованность и достоверность полученных результатов и сделанных выводов подтверждается достаточным объемом экспериментальных данных, корректностью методологии исследований, соответствием методики и методов исследования поставленным задачам. Работа выполнена на высоком методическом уровне с применением разнообразных современных экспериментальных подходов, а также с использованием статистических методов обработки данных. Все сформулированные в диссертации положения, выводы, рекомендации полностью базируются на результатах исследований. Достоверность полученных результатов подтверждается их публикацией в рецензируемых научных изданиях с высоким рейтингом, а также материалами, представленными на российских и зарубежных конференциях.

Личный вклад автора в исследование заключается в получении результатов, изложенных в диссертации, либо непосредственно им, либо при осуществлении его ведущей роли в коллективных исследованиях, а именно, планировании всех разделов экспериментальной работы, личном участии в них, анализе и обсуждении результатов, написании статей и заявок на изобретение.

Диссертация полностью соответствует критериям, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24 сентября 2013 г.

На заседании 24 ноября 2022 года диссертационный совет принял решение присудить Закатаевой Наталии Павловне ученую степень доктора биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

При проведении открытого голосования диссертационный совет в количестве 14 человек, из них докторов наук по специальности 1.5.7 – генетика – 14 человек, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, проголосовали:

за – 14, против – нет, воздержавшихся – нет.

Председатель
диссертационного совета



И.А. Захаров-Гезехус

Ученый секретарь
диссертационного совета
«24» ноября 2022 года



И.И. Горячева

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



Заместитель директора по научной
работе ИОГен РАН
д.б.н. Ю.А. Столповский