

## О Т З Ы В

на автореферат диссертации Н.П. Закатаевой на тему  
«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

Метаболическая инженерия, находящаяся в настоящее время на третьем этапе своего развития, в качестве Системной метаболической инженерии, является сложным комплексным исследованием, базирующимся на постоянно развивающихся основах Генетики, Биоорганической химии и Молекулярной биологии, и направленным на решение высоко актуальных практических задач человечества, таких, в частности, как создание новых и совершенствование имеющихся медицинских и ветеринарных препаратов, компонентов здорового и лечебного питания, кормов для животных, субстанций и ферментов для промышленности. Поэтому естественно, что серьезные работы в области метаболической инженерии, к которым, безусловно, относится и группа исследований Н.П. Закатаевой, представленных в автореферате, от самой постановки задачи до полученных результатов и практических рекомендаций и выводов являются по сути своей глубоко фундаментальными и практически значимыми.

Непосредственным объектом многолетних исследований группы сотрудников под руководством сначала проф. В.А. Лившица, а потом Н.П. Закатаевой явились метаболические пути биосинтеза пуриновых нуклеотидов в клетках бацилл, оптимизация которых методами метаболической инженерии должна была обеспечить создание и усовершенствование штаммов продуцентов этих соединений, являющихся не только важнейшими предшественниками клеточных нуклеиновых кислот, макроэргов, кофакторов и витаминов, но в том числе и важными компонентами медицинских и пищевых добавок, достаточно давно и успешно выпускаемых мировой микробиологической промышленностью. Потребность в мировом производстве этих соединений постоянно растет: так если еще в 2019 году рынок нуклеотидов составил 501,1 млн. USD, то уже в конце этого, 2022 г., ожидается объем продаж в объемах 809,3 млн. USD. Необходимо отметить, что группа, руководимая Н.П. Закатаевой, являясь передовым отрядом исследователей фирмы



Ajinomoto (Япония) - одного из мировых лидеров в создании продуцентов-нуклеотидов и производстве этих препаратов, на протяжении более 20 лет успешно улучшала производственный потенциал действующих в реальном мировом промышленном производстве штаммов, что во многом способствовало решению большого числа биотехнологических задач, связанных с расширением производства и потребления нуклеотидов. При этом спектр решаемых научных задач по непосредственному совершенствованию имеющихся и конструированию новых штаммов-продуцентов по времени совпал с переходом мировой метаболической инженерии с начальной стадии Мутагенеза и селекции в период Направленного конструирования, основанного на прецизионно ориентированной модификации бактериального генома с помощью разрабатываемого генно-инженерного инструментария, имеющего в своем арсенале как общебиологические стратегии и методы, так и объекто-специфические модификации.

Важно подчеркнуть, что основные усилия ведущих мировых лабораторий по развитию и дальнейшему совершенствованию генно-инженерного инструментария, как правило, связаны с использованием таких хорошо изученных объектов как *Escherichia coli* – модельный прокариотический организм и *Sacharomyces cerevisiae* – как член группы низших эукариот, а вот основные представители штаммов-продуцентов нуклеотидов, а именно, штаммы *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*, значительно уступали основным модельным объектам в степени разработки инструментария исследования и модификации их геномов. Поэтому не будет преувеличением сказать, что именно многолетняя и постоянная работа группы Н.П. Закатаевой по совершенствованию генетического инструментария генома бацилл: будь то: 1) оптимизация условий электротрансформации для штаммов, не способных к естественной компетентности; 2) разработка на основе термочувствительной по репликации плазмиды, в также простого и эффективного замещения аллелей рекомбинацией метода введения немаркированных мутаций в геном целевого штамма; 3) модификация этого метода с помощью использования контр-селективного маркера; 4) проведение всех конструкторских работ в условиях, исключающих появление в конечных рекомбинантных штаммах маркеров устойчивости к антибиотикам – послужили методической основой всех последующих успешных работ этой группы по созданию новых и модификации уже ранее разработанных штаммов – продуцентов на основе бацилл. Эти подходы, методы, созданные генетические элементы также были использованы в работах других исследователей как в нашей стране, так за рубежом, о чем свидетельствуют много-



численные публикации различных авторов с соответствующими ссылками на оригинальные данные Н.П. Закатаевой и соавт.

Очень поучительны результаты большого числа работ Н.П. Закатаевой по изменению регуляции ключевых генов метаболизма пуринов. В отличие от большинства аналогичных исследований, связанных с существенной амплификацией целевых генов или, наоборот, с полной делецией их структурных участков, подавляющее число достигнутых позитивных эффектов, приведших к улучшению продуктивности уже исходно продуцирующих штаммов связано с тонким «тюнингом» уровня экспрессии ключевых генетических элементов. Это достигалось как в результате прецизионного удаления негативных регуляторных элементов ( в частности, аттенуатора), в результате «по-нуклеотидной» модификации SD-последовательности отдельных генов, или отдельных коненсусных участков промоторов и т.п. Естественно, проведение таких работ, наряду с их исключительной трудоемкостью и тщательной продуманностью требует также очень высокой статистической достоверности получения результатов, а значит и большого объема продуктивных ферментаций.

Отдельный очень изящный и концептуально значимый результат, опубликованный и использованный Н.П. Закатаевой, связан с конструированием, биохимическим изучением и практическим использованием мутантного гена *prs*, кодирующим PRPP-синтетазу с измененной способностью к ретроингибированию. Отличительной особенностью этой части работы явилось то, что планирование мутагенеза не охарактеризованного к тому времени гена бацилл было осуществлено на основе сравнительного филогенетического анализа близкородственных белков, и за основу экспериментальной стратегии были выбраны мутантные варианты гена человека, приводящие к возникновению определенных и хорошо известных в медицине синдромов. В конечном итоге авторам удалось показать, что искусственный белок, адаптированный для использования в рекомбинантных штаммах бацилл, обладал значительной устойчивостью к ингибированию нуклеотидами ADP и GDP, а также сниженной потребностью в неорганическом фосфате для активации. Эти свойства мутантного белка Prs должны были увеличить эффективность синтеза PRPP, что, в конечном счете, повысило накопление инозина и гуанозина штаммами-продуцентами, подтвержденное в дальнейшем экспериментально.

Для решения важной практической задачи по созданию продуцентов нуклеозидов автором диссертации проведен достаточно широкий и глубоко фунда-



ментальный цикл исследований по обнаружению малоизвестных у бацилл генов 5'-нуклеотидаз, выделены и охарактеризованы новые гены, изучены их генетическая регуляция и свойства их белковых продуктов, способных гидролизовать различные нуклеотиды. Экспериментально показано, что повышенный уровень экспрессии некоторых из исследованных генов позволяет улучшить свойства продуцентов пуриновых нуклеозидов и некоторых других биологически активных соединений.

Еще одним чрезвычайно важным результатом работы Н.П. Закатаевой явилась идентификация генов, продукты которых могли обеспечивать экспорт нуклеозидов из клеток суперпродуцентов, созданных как на основе грамотрицательных (*E. coli*), так и грамположительных (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*). Хотя, как и в случае большинства из ранее открытых (в том числе в работах В.А. Лившица и Н.П. Закатаевой) генов экспортеров аминокислот, истинная биологическая роль экспортеров нуклеозидов в клетках дикого типа не ясна. Можно полагать, что способность соответствующих белковых продуктов к экспорту интересующих нас соединений, скорее всего, обусловлена их относительно широкой субстратной специфичностью и способностью проявлять свои экспортные функции в случае очень высокой внутриклеточной концентрации целевых соединений в клетках их суперпродуцирующих. Тем не менее, обнаружение таких потенциальных генов-экспортеров и повышение их экспрессии для оптимизации функционирования штамма-продуцента стало необходимым и уже классическим условием создания промышленно активных штаммов и в этом плане Н.П. Закатаеву можно рассматривать как одну из Мировых родоначальниц этого направления в современной метаболической инженерии. Отдельно заметим, что сами эти гены могут иметь очень широкое практическое применение, поскольку они могут сохранять свои практически полезные «экспортные» функции иногда даже в гетерологичном генетическом окружении.

Таким образом, оценивая диссертационную работу Н.П. Закатаевой в целом, можно уверенно констатировать, что представленная диссертация есть результат многолетнего очень серьезного фундаментально-практического исследования, выполненного на уровне, который во многом и определяет современный Мировой. Полученные результаты прекрасно оформлены, документированы и опубликованы как в ведущих отечественных, так и в международных научных журналах, а их приоритетность подтверждается наличием у автора многочисленных и ныне действующих международных патентов.



Нет сомнения, что по уровню и достоверности полученных результатов, по их актуальности, практической значимости выводов, полностью доказанных представленными экспериментальными материалами в реферате и в опубликованных автором работах в открытой научной печати – автореферат Н.П. Закатаевой, безусловно, удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к материалам, прилагаемым к докторским диссертациям по специальности 1.5.7 – Генетика, а сама заявитель заслуживает присуждения ей искомой степени доктора биологических наук.

Согласен на включение в аттестационное дело и дальнейшую обработку моих персональных данных, необходимых для процедуры защиты диссертации Закатаевой Наталии Павловны, исходя из нормативных документов Правительства РФ, Минобрнауки РФ и ВАК при Минобрнауки РФ, в том числе на размещение их в сети Интернет на сайте ИОГен РАН, на сайте ВАК, в единой информационной системе.

Советник по Науке АО «Научно-исследовательский  
Институт Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ»);  
профессор кафедры Синтетическая биология  
Биологического факультета МГУ им М.В. Ломоносова,  
доктор биологических наук,  
профессор



Машко Сергей Владимирович

20.09.2022

117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1 к. 1  
+7 (495)780-32-66, e-mail: Sergey\_Mashko@agri.ru

Подпись руки Машко С.В. заверяю,  
Генеральный директор АО «АГРИ»,  
Рыбак Константин Вячеславович

