

Отзыв

на автореферат диссертации 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

В работе представлена разработка методологии метаболической инженерии для промышленно важных видов бацилл – *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*. Бациллы используются в биотехнологии для получения химических веществ, необходимых в промышленности, сельском хозяйстве, медицине, в том числе рибофлавина, пуриновых нуклеозидов/нуклеотидов. Эти виды относятся к непатогенным, их генетика хорошо изучена, однако методы генетической инженерии бацилл разработаны значительно хуже, чем для *Escherichia.coli*, и не всегда применимы к производственным штаммам. Сказанное выше свидетельствует о правомерности и важности в выборе объекта исследования.

В работе представлена полная методология изменения метаболических путей с целью увеличения продукции пуриновых производных у данных видов бацилл. Она включает

- оптимизацию условий электротрансформации и разработку способа получения немаркированных мутантов, не содержащих чужеродный материал;
- поиск не идентифицированных генов с нужными свойствами, мутации в которых могут быть важны для поставленной задачи. Идентификацию новых генов и определение свойств соответствующих белков.
- внесение изменений (мутаций) в данные гены;
- определение уровня синтеза требуемых продуктов у полученных мутантных штаммов. Получение штаммов с увеличенной продукцией пуриновых производных на основе *Bacillus*.

Для внесения мутаций в хромосому был предложен способ с использованием температурочувствительной по репликации плазмиды. Этот метод в обычном виде не всегда применим, так как элиминация встроенной в хромосому плазмиды может идти с низкой частотой. Для решения этой проблемы был разработан новый оригинальный способ применения маркера контрселекции, он оказался чрезвычайно успешным и универсальным и применяется в работе с другими бактериями.

Для обеспечения эффективной конверсии нуклеотидов в нуклеозиды были использованы два способа поиска малоизученных у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* генов, кодирующих 5'-нуклеотидазы. При поиске ортологов соответствующих генов *E. coli* был идентифицирован ген *utpF* *B. subtilis* в составе оперона *utpDEF*. Соответствующий белок

способен дефосфорилировать широкий спектр важных клеточных метаболитов. Другой способ поиска подобных генов состоял в получении библиотеки генов и прямом отборе с помощью селекции по фенотипу устойчивости к ингибированию пуриновыми нуклеозидами. Таким образом были идентифицированы гены *ueeE* *B. subtilis*, кодирующий предположительную металл-зависимую фосфогидролазу, и *yitU* *B. amyloliquefaciens*. Субстратом для которого является преимущественно FMN. Сверхэкспрессия *yitU* увеличивает внеклеточное накопление рибофлавина, нуклеозидов и AICAr (акадезина) у *B. subtilis*.

Другим достижением представленной работы является идентификация генов, продукты которых обеспечивают экскрецию пуриновых нуклеозидов из клеток, *yicM* (*perI*) у *E. coli* и *pbuE* (*ydhL*) у *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*. Сверхэкспрессия гена *pbuE* усиливает экскрецию инозина и гуанозина штаммами-продуцентами на основе *Bacillus*.

Были выявлены мутации, позволяющие убрать негативную регуляцию и усилить экспрессию генов биосинтеза пуриновых нуклеотидов. Точечные мутации в промоторной области и делеция последовательности гуанинового рибопереключателя в 5'-нетранслируемой области первого гена пуринового оперона усиливают экспрессию генов оперона и увеличивают в 1,8 и 1,6 раза накопление и выход целевого продукта инозина у *B. subtilis*.

По аналогии с известными заменами в PRPP-синтетазе PRS1 человека были определены, а затем получены мутации *prs* гена *B. amyloliquefaciens*, которые придают ферменту устойчивость к ингибированию ADP и GDP, а также усиливают его активацию при более низких концентрациях неорганического фосфата. Введение мутаций в ген *prs* на хромосоме штаммов-продуцентов инозина и гуанозина на основе *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* приводит к увеличению продукции нуклеозидов.

Даже краткое перечисление результатов позволяет утверждать, что работа имеет большое значение как для фундаментальной науки, так и для практической лабораторной работы, и для промышленной биотехнологии.

В работе решается целый спектр задач, однако все они органично связаны друг с другом, и работа является цельной и законченной. Используемые методы чрезвычайно разнообразны, трудоемки и - можно сказать - филигранны.

Выводы автора вполне обоснованы, их достоверность не вызывает сомнений. Научная значимость работы подтверждается списком публикаций в журналах, рекомендуемых ВАК, и участием в конференциях, а практическая - внушительным списком патентов. По актуальности проведенного исследования, объему полученного материала, новизне и значимости полученных результатов работа Наталии Павловны

Закатаевой отвечает требованиям ВАК Минобрнауки Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени.

31 октября 2022 года

Главный научный сотрудник
Института общей генетики
им. Н.И.Вавилова РАН
epolu@vigg.ru

д.б.н. Е.У.Полужктова

Специальность, по которой рецензентом защищена диссертация: 1.5.7 - Генетика

Адрес организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Тел.: (499) 135-62-13,

Почтовый адрес: 119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, д. 3

Email: iogen@vigg.ru

Подпись Е.У. Полужктовой удостоверяю
Ученый секретарь ИОГен РАН



д.б.н. И.И. Горячева

Согласна 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.

д.б.н. Е.У. Полужктова