

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

Диссертационная работа Н.П. Закатаевой посвящена абсолютно актуальной теме — разработке удобного генно-инженерного инструментария для метаболической инженерии бациллярных штаммов, которые являются одними из основных «рабочих лошадок» современной биотехнологии. Разработанный диссертантом подход позволяет без использования традиционного генетического метода селекции по фенотипическому признаку вводить в хромосому культуры-продуцента целевого продукта немаркированные генетические модификации по так называемому бесшовному типу. Преимущества данного разработанного метода обеспечивают широчайшие возможности его применения, как для некомпетентных штаммов микроорганизмов, так и при необходимости многократного генно-инженерного редактирования геномов.

Предлагаемый метод метаболической инженерии разрабатывался Н.П. Закатаевой на генетической системе бациллярного биосинтеза и метаболизма пуриновых нуклеотидов, играющих ключевые роли в синтезе, как нуклеиновых кислот, так и молекул-носителей макроэргических связей, аминокислот, витаминов и некоторых кофакторов. Важно помнить, что различные пуриновые соединения широко используются в медицине благодаря их положительному воздействию на ключевые клеточные функции, для лечения метаболического синдрома, при специфической индукции апоптоза в В-клетках, с целью ослабления ишемии, ингибирования пролиферации раковых клеток, в качестве сильнодействующих противовирусных препаратов, а также в качестве антиоксидантов и нейромедиаторов.

Ещё сравнительно недавно методы селекции штаммов-продуцентов пуриновых соединений основывались на использовании мутагенеза и традиционной селекции с последующим скринингом на средах, содержащих токсичные аналоги метаболитов. Однако этот подход не позволял получать направленные изменения метаболических потоков для создания высокоэффективных продуцентов с заданными биотехнологическими характеристиками. Использование бациллярных культур в большинстве своём не обладавших природной компетентностью, также сдерживало прогресс в получении продуцентов пуринов. Ещё одна задача, которую приходится

решать селекционерам, это требование к промышленным продуцентам отсутствия маркеров устойчивости к антибиотикам, при сохранении стабильности синтеза целевых продуктов в условиях биотехнологических производств. В автореферате диссертации Н.П. Закатаевой превосходно показано, как автору удалось преодолеть все эти трудности и научиться вносить желаемые изменения в метаболизм продуцентов исключительно путем направленных немаркированных генетических модификаций хромосом.

Прекрасное знание физиологии микробных объектов и их биохимии позволило автору в ходе выполнения работы с успехом применять многочисленные экспериментальные приёмы. Это и культивирование клеток в присутствии осмопротекторов для улучшения процесса регенерации клеток трансформантов, и оптимизация получения жизнеспособных клонов после электротрансформации, и использование термочувствительных (по репликации) векторов при ведении плазмид, доставлявших генетически модифицированные фрагменты ДНК, и детальное исследование влияния присутствия фосфатов на отдельные метаболические реакции, и, наконец, использование специальных ростовых сред для наиболее эффективного использования дорогостоящих пуриновых аналогов. Совершенное владение молекулярно-генетическими методами позволило автору для регуляции экспрессии важных генов провести много целенаправленных, в том числе множественных, модификаций «-10 нп участков». Подбор генов, используемых при конструировании продуцентов, на основании сравнения ленточных диаграмм 3D-пространственных структур соответствующих белков, также дал положительные результаты. Превосходно была решена и задача защиты клеток культур-продуцентов от стресса, вызываемого сверхвысокими концентрациями пуриновых нуклеозидов, путём повышенной экскреции пуриновых нуклеозидов из клетки за счет их повышенной экскреции при амплификации соответствующих генов-экспортеров.

В целом могу согласиться с автором — конструирование действительно высокопроизводительных культур-продуцентов целевых биологически активных соединений нельзя представить без применения современных методов метаболической инженерии, без комплексного улучшения клеточной активности, без скоординированных изменений ферментативных, транспортных и регуляторных функций клетки с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Но только высококвалифицированным исследователям удастся реализовывать такой подход, на основе детального изучения геномов используемых биообъектов, на точном знании метаболических потоков, при использовании транскрипционного анализа, а также при владении совершенной технологией для введения генно-инженерных модификаций, что полностью продемонстрировано в работе Н.П. Закатаевой.

В заключение, не могу не пожелать автору написать обзорную статью по истории исследований нуклеинового биосинтеза и обмена, начатых нашими коллегами ещё в восьмидесятые годы прошлого века — такой материал мог бы стать хорошим подспорьем для новых поколений генетиков.

На мой взгляд, содержание и оформление автореферата диссертации позволяет заключить, что по огромному объёму представленных надёжных экспериментальных данных и по уровню биосинтетической активности полученных культур-продуцентов, работа Наталии Павловны Закатаевой удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.7. — генетика, а её автор заслуживает присуждения искомой учёной степени.

Я согласен на включение в аттестационное дело и дальнейшую обработку моих персональных данных, необходимых для процедуры защиты диссертации Н. П. Закатаевой, 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.

Складнев Дмитрий Анатольевич,
д.б.н. (по специальности 1.5.6. биотехнология), профессор,
главный научный сотрудник
лаборатории выживаемости микроорганизмов
ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии»,
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН
Тел. +7 916 623 55 90, эл. почта: skladda@gmail.com

12 10 2022


Д.А. Складнев

Подпись Д.А. Складнева заверяю,
Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН,
д.б.н.


01. 11. 2022


И.С. Мысякина

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), РФ, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2. Тел. +7 (495) 954-52-83, эл. почта: info@fbras.ru