

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по диссертации Дорошенко Веры Георгиевны «Направленные модификации хромосомы *Escherichia coli* для системного конструирования продуцента фенилаланина» на соискание ученой степени доктора биологических наук.**

Решение диссертационного совета от 18 мая 2021 г. № 4 о присуждении Дорошенко Вере Георгиевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени доктора биологических наук

Диссертация **Дорошенко Веры Георгиевны «Направленные модификации хромосомы *Escherichia coli* для системного конструирования продуцента фенилаланина»** по специальности – 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) принята к защите 12 февраля 2021 г. протокол №1 диссертационным советом Д002.247.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр.2. Совет утвержден Министерством образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России) приказом № 205/нк от 16.03.2017 г.

Соискатель **Дорошенко Вера Георгиевна**, 1959 года рождения, гражданка РФ, в 1983 г. окончила с отличием Московский инженерно-физический институт по специальности «Дозиметрия и защита». С 1983 г. по 1999 г. работала во Всесоюзном научно-исследовательском институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ВНИИ Генетика). В 1988 г. защитила кандидатскую диссертацию по специальности «Генетика». С 1999 г. по настоящее время работает старшим научным сотрудником в Акционерном Обществе «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ»).

Научный консультант – **Машко Сергей Владимирович**, доктор биологических наук, профессор, Советник Генерального директора по науке Акционерного Общества «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ»).

Официальные оппоненты:

**Абилев Серикбай Каримович**, доктор биологических наук, профессор, ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук;

Демидюк Илья Валерьевич, доктор химических наук, доцент, профессор Российской академии наук, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»;

Патрушев Лев Иванович, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности - в своем положительном заключении указала, что диссертационная работа Дорошенко В.Г. является законченной самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных исследований, развивающих принципы конструирования штаммов-продуцентов аминокислот на основе *E. coli*, решена проблема получения продуцента фенилаланина нового поколения. Диссертационная работа соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №8 42, а сама автор, Дорошенко В.Г., заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области микробиологии и биотехнологии. Так, доктор биологических наук Абилев Серикбай Каримович известен своими исследованиями в области направленных генетических изменений у *E. coli*. Доктор химических наук Демидюк Илья Валерьевич известен своими работами в области исследования генетических регуляций у микроорганизмов. Патрушев Лев Иванович, доктор биологических наук, известен своими работами в области молекулярно-генетических исследований эу- и прокариотических клеток. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в цитируемых российских и зарубежных журналах. Выбор ведущей организации связан с тем, что в учреждении проводятся исследования в области разработки технологий промышленного производства широкого круга биопрепаратов, что также подтверждается наличием соответствующих публикаций. Высокая квалификация оппонентов и ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 13 статьях и 10 патентах в рецензируемых научных изданиях, которые удовлетворяют требованиям п.11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1. **Doroshenko V.G.**, Livshits V.A. Structure and mode of transposition of Tn2555 carrying sucrose utilization // *FEMS Microbiology Letters*. – 2004. – V. 233. – P.353-359.

2. Зименков Д.В., Скороходова А.Ю., Каташкина Ж.И., Минаева Н.И., Саврасова Е.А., Бирюкова И.В., **Дорошенко В.Г.**, Ахвердян В.З., Машко С.В. Области хромосомы *E.coli*, предпочтительные для встраивания генов при использовании системы интеграции на основе фага-транспозона Mu // Биотехнология. – 2004. – Т. 6. – С. 3-18.
3. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., **Дорошенко В.Г.**, Бирюкова И.В., Машко С.В. Направленное изменение уровня экспрессии генов в бактериальной хромосоме // Молекулярная Биология. – 2005. – Т.39. – № 5. – С. 823-831.
4. **Doroshenko V.**, Airich L., Vitushkina M., Kolokolova A., Livshits V., Mashko S. YddG from *Escherichia coli* promotes export of aromatic amino acids // FEMS Microbiology Letters. – 2007. – V. 275. – P. 312-318.
5. Киверо А.Д., Бочаров Е.В., **Дорошенко В.Г.**, Соболев А.Г., Дубинный М.А., Арсеньев А.С. Изучение потоков углерода при утилизации глюкозы *Escherichia coli* MG1655 с помощью 2D(<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) ЯМР-спектроскопии // Прикладная Биохимия и Микробиология. – 2008. – Т. 44. – С. 168-175.
6. Цыренжапова И.С., **Дорошенко В.Г.**, Айрих Л.Г., Миронов А.С., Машко С.В. Ген *yddG Escherichia coli*, кодирующий потенциальный экспортер ароматических аминокислот: конститутивная транскрипция и зависимость уровня экспрессии от скорости роста клеток // Генетика. – 2009. – Т. 45. – № 5. – С. 601-609.
7. Airich L.G., Tsyrenzhapova I.S., Vorontsova O.V., Feofanov A.V., **Doroshenko V.G.**, Mashko S.V. Membrane topology analysis of the *Escherichia coli* aromatic amino acid efflux protein YddG // Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. – 2010. – V. 18. – P.189-197.
8. **Doroshenko V.G.**, Shakulov R.S., Kazakova S.M., Kivero A.D., Yampolskaya T. A., Mashko S.V. Construction of an L-phenylalanine-producing tyrosine- prototrophic *Escherichia coli* strain using *tyrA* *ssrA*-like tagged alleles // Biotechnology Letters. – 2010a. – V. 35. – P. 1117-1121.
9. **Doroshenko V.G.**, Tsyrenzhapova I.S., Krylov A.A., Kiseleva E.M., Ermishev V.Y., Kazakova S.M., Biryukova I.V., Mashko S.V. Pho regulon promoter-mediated transcription of the key pathway gene *aroG* (*Fbr*) improves the performance of an L-phenylalanine-producing *Escherichia coli* strain // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2010b. – V. 88.– P. 1287-1295.
10. **Дорошенко В.Г.**, Лобанов А.О., Федорина Е.А. Направленное изменение *Escherichia coli* MG1655 с целью получения мутантов, продуцирующих гистидин // Прикладная Биохимия и Микробиология. – 2013. –Т. 49. – № 2.– С. 149-154.
11. Слесарева А.Е., Кун Л.Г., **Дорошенко В.Г.** Сравнение моно- и бифункциональной хоризматсинтаз в клетках *Escherichia coli*, не продуцирующих и продуцирующих фенилаланин // Биотехнология. – 2017. – Т. 33. – № 2. – С. 48-55.
12. Машко С.В., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Мичурина Т.А., Гавриков А.В., Беневоленский М.С., Киверо А.Д., Каташкина Ж.И., **Дорошенко В.Г.**, Бирюкова И.В., Дебабов В.Г.Использование метаболической регуляции для оптимизации генов в бактериальных клетках – новое направление биотехнологии XXI века // Биотехнология. – 2002. –№ 4. – С. 3-14.
13. **Дорошенко В.Г.**, Лившиц В.А., Айрих Л.Г., Шмагина И.С., Саврасова Е.А., Овсиенко М.В., Машко С.В. Метаболическая инженерия *Escherichia coli* для продукции фенилаланина и родственных соединений // Биотехнология. – 2014. – Т. 30. – № 4. – С. 8-27.
14. Livshits V.A., **Doroshenko V.G.**, Mashko S.V., Akhverdian V.Z., Kozlov Yu.I. Amino acid producing strains belonging to the genus *Escherichia* and method for producing amino acid // European Patent EP 1149911 (03.04.2002). – 6 p.

15. Лившиц В.А., **Дорошенко В.Г.**, Машко С.В., Ахвердян В.З., Козлов Ю.И. Способ получения L-аминокислот, штамм *Escherichia coli* – продуцент аминокислоты (варианты) // Патент РФ RU 2212447 (20.09.2003). – 10 с.
16. Лившиц В.А., Витушкина М.В., Машко С.В., **Дорошенко В.Г.**, Бирюкова И.В., Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Беларёва А.В. Способ получения L-аминокислот, штамм *Escherichia coli* – продуцент аминокислоты // Патент РФ 2222596 (27.01.2004). – 8 с.
17. Лившиц В.А., Витушкина М.В., Гусятинер М.М., Зиятдинов М.Х., Ахвердян В.З., Саврасова Е.А., **Дорошенко В.Г.**, Машко С.В. Способ получения L-аминокислот с использованием бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* // Патент РФ 2229513 (27.05.2004). – 9 с.
18. Каташкина Ж.И., Лунц М.Г., **Дорошенко В.Г.**, Фомина С.А., Скороходова А.Ю., Ивановская Л.В., Машко С.В. Способ получения L-аминокислот с использованием бактерий с оптимизированным уровнем генной экспрессии // Патент РФ № 2268305 (20.01.2006). – 5 с.
19. Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Каташкина Ж.И., Киверо А.Д., Бирюкова И.В., **Дорошенко В.Г.**, Машко С.В. 6 – Фосфоглюконолактоназа из *Escherichia coli*, фрагмент ДНК, бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia*, - продуцент L-аминокислоты, и способ получения L-аминокислоты // Патент РФ № 2288268 (27.11.2006). – 25 с.
20. Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М., **Дорошенко В.Г.**, Скороходова А.Ю., Филиппов Д.В. Способ получения l-треонина с использованием бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, в которой инактивирован кластер генов *sfmacd fh-fimz* или ген *fimz* // Патент РФ № 2333953 (20.09.2008). – 24 с.
21. Шакулов Р.С., Клячко Е.В., **Дорошенко В.Г.**, Айрих Л.Г. Способ получения аминокислот с использованием бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia* // Патент РФ № 2264459 (10.08.2010). – 57 с.
22. Айрих Л.Г., **Дорошенко В.Г.**, Цыренжапова И.С., Имаизуми А. Способ получения L-аминокислоты // Патент РФ №2405040 (27.11.2010). – 73 с.
23. Айрих Л.Г., **Дорошенко В.Г.**, Цыренжапова И.С. Мутантный белок, кодируемый геном *yddG*, и способ получения ароматических L-аминокислот с использованием бактерии рода *Escherichia* // Патент РФ № 2530171 (10.10.2014). – 23 с.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных и российских конференциях: 1) Keystone Symposium: Transposition and site-specific recombination (Santa Fe, New Mexico, USA. 1997); 2) IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008); 3) Генетика микроорганизмов и биотехнология, Международная школа-конференция, посвящённая 40-летию создания ГосНИИгенетика (Москва-Пушино, 2008); 4) III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology “BioMicroWorld 2009” (Lisbon, Portugal, 2009); 5) Школа-конференция «Генетика микроорганизмов: от геномики к биоэкономике», посвящённая 50-летию НИЦ «Курчатовский институт-ГосНИИгенетика» (Москва, 2018).

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

**На диссертацию поступили следующие отзывы:**

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Абилов Серикбай Каримович, (положительный).** Отзыв содержит следующие замечания:

1. К недостаткам изложения следует отнести отсутствие рекомендаций по использованию результатов и выводов работы на территории РФ.
2. В тексте встречаются незначительные опечатки
3. Электрофореграмма SDS-ПААГ на рис. 3.21 – малоинформативная, т.к. разница между дорожками, соответствующими разным штаммам, не видна.

**Отзыв официального оппонента доктора химических наук Демидюк Илья Валерьевич (положительный).** Отзыв содержит следующие замечания:

1. «... Положительное впечатление от работы «смазывается» тем, что в ней не представлена комбинация в одном штамме-продуценте разработанных автором подходов к повышению продукции фенилаланина бактериями. Причина этого, вероятно, кроется в том, что такой продуцент и сама информация об успешном комбинировании подходов представляют существенную коммерческую ценность и защищаются обладателем интеллектуальной собственности в режиме, препятствующим публикации в открытом источнике. Однако отсутствие соответствующих данных в диссертации не позволяет оценить, насколько предложенные новые стратегии действительно полезны для создания продуцентов фенилаланина и других ароматических аминокислот. Правда, автор отдельно отмечает в тексте, что та или иная его разработка применена при конструировании промышленного продуцента, что свидетельствует в пользу эффективности этих решений.
2. Остальные замечания носят более конкретный характер. Так, представляя количественные результаты, автор далеко не всегда приводит значения ошибок эксперимента (например, таблицы 3.1, 3.5, 3.7 и др, рис. 3.6, 3.7 и др). В связи с этим возникает вопрос об обоснованности сделанных автором интерпретаций различий между полученными значениями ...
3. В разделе «Материалы и методы» при описании условий центрифугирования следовало бы указать, помимо скорости вращения ротора (об/мин), еще и радиус ротора. Более корректным было бы заменить данные параметры, как обычно принято, фактором разделения.
4. Некоторое недоумение вызывает то, в тексте встречается три варианта написания слова «секвенирование».

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Патрушев Лев Иванович, (положительный).** Отзыв содержит следующие замечания:

«В качестве пожелания хотелось бы предложить подумать об использовании в будущем систем на основе бактериальных CRISPR-CAS, которые в настоящее время эффективно применяются для прецизионного редактирования *in vivo* как бактериальных, так и эукариотических геномов».

**Отзыв ведущей организации Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности** – отзыв положительный замечаний нет.

Пожелание: «оформить Приложение документов, подтверждающих высочайшую научную и интеллектуальную составляющую, а также внедрение результатов работы в мировую практику. Раздел «Приложения» не является обязательным разделом диссертации. Вместе с тем, этот раздел позволяет представить различные вспомогательные материалы,

дополняющие и иллюстрирующие основной текст диссертации, что значительно усиливает положительное впечатление о работе диссертанта».

**На автореферат поступили положительные отзывы. Отзывы прислали:**

1. Киселев С.Л. – д.б.н., профессор, заведующий лабораторией эпигенетики, ФГБУН ИОГен РАН
2. Даниленко В.Н. – д.б.н., профессор, зав. отделом генетических основ биотехнологии ФГБУН ИОГен РАН
3. Синеокий С.П. – д.б.н., профессор, директор БРЦ ВКПМ, НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика
4. Алёшин В.В. – д.б.н., внс отдела эволюционной биохимии НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова
5. Вейко В.П. – д.б.н., профессор, гнс лаборатории молекулярной инженерии ФИЦ Биотехнологии РАН
6. Долгих Д.А. – д.б.н., профессор, руководитель лаборатории инженерии белка ИБХ РАН
7. Каратаев Г.И. – д.б.н., руководитель лаборатории генетики бактерий, внс ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ
8. Птицын Л.Р. – д.б.н., доцент, специальный научный сотрудник, АО «АГРИ».

Все отзывы положительные, замечаний нет.

**Вопросы задавали:** д.б.н. Плаунов В.К., д.б.н. Горленко В.М., д.б.н. Дедыш С.Н., д.б.н. Пименов Н.В., д.б.н. Терёшина В.М.

**В дискуссии приняли участие:** д.б.н. Пименов Н.В., д.б.н. Машко С.В. (АО «АГРИ»), к.б.н. Стойнова Н.В. (директор по науке АО «АГРИ»), д.б.н. Плаунов В.К., д.б.н. Складнев Д.А.

**Диссертационный совет отмечает, что** Дорошенко В.Г. были разработаны новые подходы к конструированию штаммов продуцентов, основанные на последовательной модификации нескольких генов, отработанные на примере создания продуцента гистидина.

Применение этого метода открыло путь к получению мутантов, у которых были существенно ограничены конкурирующие пути биосинтеза тирозина и триптофана, перенастроена регуляция ряда ключевых ферментов. Это позволило добиться высокой продуктивности синтеза L-фенилаланина из сахарозы и аммония при сохранении прототрофности по тирозину, но без накопления этой аминокислоты в качестве побочного продукта. Автором был подобран высокоэффективный способ снижения токсичности L-фенилаланина для продуцента за счет его эффективной секреции из клеток.

Накопленный научный опыт позволил В.Г. Дорошенко не только получить новые штаммы продуценты, внедренные в мировое производство фенилаланина, но разработать методические подходы, используемые при создании продуцентов аминокислот и других соединений на основе *E. coli*. В частности, разработанная методология манипуляции с экспрессией генов непосредственно в хромосоме, активно применяемая в генно-инженерной работе в АО «АГРИ».

**Диссертационный совет также отмечает, что** диссертация Дорошенко В.Г. является законченной научно-квалификационной работой, посвященной изучению генетической регуляции механизмов биосинтеза аминокислот и конструированию высокоэффективных бактериальных продуцентов этих соединений. По совокупности представленных результатов диссертационная работа может быть классифицирована как существенное научное достижение в области микробиологии, что соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней».

**Теоретическая значимость исследования** обоснована тем, что впервые исследован белок-экспортер ароматических аминокислот YddG, разработаны подходы к усилению его экспрессии, обосновано использование данного эффлюкс-белка для повышения устойчивости к высоким концентрациям фенилаланина. Разработан новый оригинальный подход контроля активности ключевых ферментов метаболических путей за счет настройки интенсивности их деградации АТФ-зависимыми протеазами клетки. Продемонстрирована возможность использования в *E. coli* гетерологичной бифункциональной хоризмат-синтазы из *Saccharomyces cerevisiae*.

Впервые исследована первичная структура и генетическая организация сахарозного псевдотранспозона Tn2555.3, кодирующего ферменты утилизации сахарозы с транспортом, зависимым от фосфотрансферазной системы, предложена и экспериментально подтверждена модель транспозиции Tn2555. Охарактеризован экспортер ароматических аминокислот YddG и получены модификации штамма *E. coli* с повышенным уровнем экспрессии YddG, приводящие к активации экспорта аминокислоты из клетки. Разработан новый подход ослабления конкурирующего пути биосинтеза, основанный на С-концевой протеолитической деградации хоризматмутазы/префенатдегидрогеназы и с использованием этого подхода был впервые получен продуцент L-фенилаланина *E. coli*, не нуждающийся в тирозине и не накапливающий его в процессе ферментации. Впервые продемонстрировано использование хоризматсинтазы *Saccharomyces cerevisiae* для продукции L-фенилаланина

в *E. coli*. Впервые показано использование промоторов Pho-регулона для повышения продукции аминокислот, в частности, L-фенилаланина.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики** подтверждается тем, что многие из разработанных подходов и генетических модификаций были практически использованы при создании штаммов-продуцентов фенилаланина, внедренных фирмой «Аджиномото» (Япония) в действующее биотехнологическое производство. По результатам работы получено 10 патентов на изобретения на способы получения аминокислот и штаммы-продуценты, в том числе один международный.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила**, что данные исследования получены на современном сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов. Диссертационная работа В.Г. Дорошенко выполнена с применением комплекса микробиологических, физико-химических и молекулярно-генетических методов. Анализ и обсуждение полученных результатов проведен с исчерпывающей полнотой.

Материалы диссертации представлены автором в 23 печатных работах: 2 обзорных и 11 экспериментальных статьях, в том числе в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК, и в 10 патентах на изобретения. Автореферат полностью отражает основные научные результаты диссертации.

**Личный вклад соискателя состоит** в непосредственном участии на всех этапах выполнения диссертационной работы: постановке проблемы, разработке и апробации экспериментальных методов, проведении экспериментов, обработке и обобщении полученных результатов, написании статей, представлении полученных результатов на конференциях.

Диссертация соответствует профилю Совета и требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук в соответствии с «Положением о порядке присуждения ученых степеней».

Диссертация **Дорошенко Веры Георгиевны «Направленные модификации хромосомы *Escherichia coli* для системного конструирования продуцента фенилаланина»** является законченной научно-квалификационной работой, посвященной изучению генетической регуляции механизмов биосинтеза аминокислот и конструированию высокоэффективных бактериальных продуцентов этих соединений.

Работа соответствует профилю Диссовета Д002.247.02 и требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук

