

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Дорошенко Веры Георгиевны «Направленные модификации хромосомы *Escherichia coli* для системного конструирования продуцента фенилаланина», представленной на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

В настоящее время в России достаточно мало исследований, посвящённых инженерии метаболизма бактерий с целью получения продуцентов полезных веществ. Тематика работы - получение штаммов-продуцентов аминокислот, на примере фенилаланина, на основе *Escherichia coli* методами метаболической инженерии **актуальна** для развития микробиологического производства в стране. В Акционерном обществе «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика», являющемся структурным подразделением компании Аджиномото (Япония), накоплен уникальный опыт получения промышленных продуцентов для этой компании, о чём свидетельствует данная работа.

Диссертация В.Г. Дорошенко является **оригинальным завершённым научным исследованием**, в ее основу положены результаты собственных исследований диссертанта, проводившихся в период с 1997 по 2017 гг., о чём свидетельствуют даты публикаций. В тоже время основные результаты работы были получены по утверждению автора в период работы над проектом «Фенилаланин» (2000-2013 гг.) сначала в качестве ответственного исполнителя, а затем руководителя группы, выполняющей этот проект.

Проведённые в работе исследования касались разработки новых пионерских подходов к усовершенствованию промышленного продуцента фенилаланина, отвечающего новым законодательным ограничениям на использование плазмидных штаммов, а также с целью повышения рентабельности действующего производства.

В работе сделан акцент на получении продуцента фенилаланина с известной первичной структурой. Поэтому и новые генетические модификации и сами продуценты, в которых они анализировались по их эффекту на продукцию аминокислоты, были получены современными методами. Это рекомбинационная инженерия с использованием Red системы фага λ , либо с применением разработанных в Институте систем интеграции в хромосому на основе бактериофагов Mu и $\phi 80$. В работе были использованы некоммерческие, разрешённые к публикации в открытой печати штаммы, названные автором модельными.

Использование сахарозы, происходящей из отходов сахарного производства, для получения фенилаланина было востребовано, но лабораторные штаммы, на основе которых получали продуценты, в силу факультативности этого признака у энтеробактерий, не утилизировали сахарозу в качестве источника углерода. В работе был исследован сахарозный транспозон Tn2555, который оказался псевдосоставным, т.е. он как составной транспозон был фланкирован копиями элемента IS26, но не перемещался как единое целое. Tn2555 мог вызывать перестройки генома и был непригоден для использования в продуцентах, которые должны были отвечать требованию неизменной и определённой структуры генома. Для получения таких штаммов автором был разработан способ введения генов утилизации сахарозы в хромосому при помощи искусственной системы Mu- интеграции и последующего картирования таких интеграций методом «обратной ПЦР».

С применением модельных штаммов-продуцентов доказана перспективность использования охарактеризованного в работе экспортёра ароматических аминокислот YddG. Это белок внутренней мембраны *E. coli*, кодировался одноимённым геном, экспрессирующимся в штамме дикого типа на низком, плохо детектируемом уровне. В работе показано, что активизация YddG, достигаемая за счёт подстановки его гена под сильный конститутивный промотор необходима для максимизации продукции каждой из ароматических аминокислот в соответствующем штамме-продуценте.

Несомненной новизной является подход получения продуцента фенилаланина, не нуждающегося в тирозине и не продуцирующего его в качестве примеси. Используемые продуценты фенилаланина были тирозиновыми ауксотрофами (Tyr^-) в виду того, что эти аминокислоты имели почти идентичные пути биосинтеза. Добавление тирозина в ферментационную среду приводило к зависимости стоимости фенилаланина от стоимости используемого тирозина. С другой стороны, продуценты Tyr^+ накапливали тирозин в качестве примеси, затрудняющей очистку основного продукта. Для получения продуцента фенилаланина Tyr^+ , не накапливающего тирозин, был подобран уровень снижения активности префенатдегидрогеназы (ген *tyrA*), ключевого фермента биосинтеза тирозина, с использованием С-концевого программируемого протеолиза или вариантов *ssrA*-хвостов, присоединяемых к гену *tyrA*.

С помощью бифункциональной хоризмат-синтазы из *Saccharomyces cerevisiae* в работе была впервые исследована потребность во флавиномононуклеотиде при сверхсинтезе фенилаланина в *E. coli*. И, таким образом, впервые предложено использование гетерологичной хоризмат-синтазы для синтеза фенилаланина в клетках *E. coli*.

Приоритетным является применение метаболической регуляции для биосинтеза фенилаланина в продуценте. Частичное разделение фаз роста и продукции с помощью использования промоторов Pho-регулона, реагирующих на истощение неорганического фосфата в среде, сказалось положительно на накоплении аминокислоты.

Отмеченные здесь коротко достижения автора хорошо показывают **новизну практическую и теоретическую значимость обсуждаемой диссертации.**

Остановимся на анализе самой работы. Она изложена на 210 страницах, состоит из введения, 5 глав литературного обзора, обширного раздела «Материалы и методы» (11 пунктов), раздела «Результаты и обсуждение» (6 пунктов), заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы

(308 источников). Диссертация содержит 46 иллюстраций (рисунки, графики, диаграммы) и 28 таблиц.

Во введении представлены актуальность темы, цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость, сформулированы научные положения, выносимые на защиту.

Цель и задачи диссертации соответствуют заявленной специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

В первой главе **литературного обзора** даётся понятие системного конструирования штаммов, включающего не только инженерию биосинтетического пути, но и учитывающего запросы параллельно разрабатываемых процессов ферментации и очистки продукта. В четырёх последующих главах **обзора литературы** рассмотрена необходимая научная информация для понимания подходов, разрабатываемых автором для решения каждой из поставленных задач.

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов подтверждается современными методами исследования и анализа, которые изложены в **разделе «Материалы и методы»**. В этом разделе также содержится подробное описание получения всех генетических модификаций работы, включая получение плазмид и внесения изменений в хромосому *E. coli*.

Каждый из шести пунктов **«Результатов и обсуждения»** посвящён решению отдельной задачи диссертации. 1. Это изучение сахарозного транспозона Tn2555; получение сахарозоположительных штаммов *E. coli* с детерминированным геномом; получение продукции фенилаланина и триптофана из сахарозы. 2. Конструирование модельных продуцентов ароматических аминокислот и гистидина методом рекомбинационной инженерии. 3. Исследования мембранного белка *E. coli*, кодируемого геном *uddG*. 4. Получение продуцента фенилаланина TugA⁺, не накапливающего тирозин в виде примеси, которая бы мешала очистке фенилаланина. 5. Изучение применимости бифункциональной хоризмат-синтазы дрожжей для

сверхсинтеза фенилаланина в *E. coli*. 6. Исследования, которые привели к идее использования Pho-регуляции; получение штаммов с геном 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат-синтазы (ключевого фермента биосинтеза ароматических соединений), нечувствительной к фенилаланину, под контролем промоторов Pho-регулона и их проверка в ферментации.

В **Заключении** автор определяет место своей работы в развивающейся истории конструирования продуцентов.

Выводы полностью обоснованы. Полученные автором результаты соответствуют заявленной цели и задачам.

Автореферат соответствует содержанию диссертации и включает основные ее положения.

Результаты работы были апробированы. Они, докладывались на конференциях разного уровня, в том числе и внутри компании. По теме диссертации опубликовано 13 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, причём большая часть статей упоминается в международных базах периодических изданий (PubMed, Scopus), а так же 10 патентов (большинство из которых являются международными, т.к. запатентованы компанией Аджиномото в нескольких странах), в которых закреплена **практическая значимость** работы.

Диссертация хорошо оформлена. Логично построена.

Замечания по работе сделаны следующие.

1. К недостаткам изложения следует отнести отсутствие рекомендаций по использованию результатов и выводов работы на территории Российской Федерации.
2. В тексте встречаются незначительные опечатки. На стр. 109 пропущены две запятые во втором и третьем предложениях сверху страницы. На стр. 111 в третьей строке сверху присутствует опечатка в окончании слова: вместо «плазмиды» надо «плазмид», т.к. их две. На стр. 115, 6 строка снизу, в глаголе «подавляться» отсутствует мягкий знак. Запятая также пропущена на стр. 119, строка 10 снизу, после причастного оборота со словом «содержащих».

2. Электрофореграмма SDS-ПААГ на рис. 3.21 - малоинформативная, т.к. разница между дорожками, соответствующими разным штаммам, не видна.

Сделанные замечания не снижают высокой научно-практической ценности работы. Обсуждаемая диссертация соответствует требованиям Положения о присуждении ученых степеней, утв. постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Дорошенко Вера Георгиевна, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Доктор биологических наук, профессор
ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт общей
генетики им. Н.И. Вавилова Российской
академии наук *119333*
г. Москва, ул. Губкина, 3. ИОГен РАН,
abilev@vigg.ru
тел: +7- 499-135-62-13

Абилев Серикбай Каримович

Подпись С.К. Абилева «ЗАВЕРЯЮ»

Заместитель директора по научной работе
Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН
доктор биологических наук

Ю.А. Столповский

20.04.2021 г.

