

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу **Дорошенко Веры Георгиевны**
**«Направленные изменения хромосомы *Escherichia coli* для системного
конструирования продуцента *L*-фенилаланина»,**
представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по
специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Использование ферментации рекомбинантных микроорганизмов было и остается наиболее перспективным решением для получения ароматических аминокислот. Однако искусственное перенаправление метаболизма клеток на путь синтеза ароматических аминокислот для получения высокой продуктивности требует значительно больших усилий, чем при создании продуцентов других аминокислот и первичных метаболитов. Длина и сложность регуляции этого пути требуют использования комплексных решений, объединяющих взаимодополняющие подходы и методы, для преодоления узких мест биосинтеза. Как следствие, в последние 20 лет во всем мире активно ведутся работы по конструированию эффективных «элементарных блоков», из которых в дальнейшем могут быть собраны высокоэффективные продуценты ароматических аминокислот. Эти работы, кроме очевидной практической значимости, расширяют наше понимание микробного метаболизма и механизмов его регуляции. К сожалению, широкому научному сообществу практически никогда не становятся доступными результаты самых удачных работ и информация о наиболее успешных примерах интеграции элементарных блоков в составе штаммов-продуцентов, так как эффективные решения имеют существенную коммерческую ценность.

Диссертационная работа Веры Георгиевны Дорошенко находится в русле описанной выше тенденции и является ярким примером применения подхода, получившего название метаболической инженерии. Исследование имеет выраженную прикладную направленность и, в основном, посвящено разработке новых стратегий усовершенствования продуцента фенилаланина с учетом требований современного производства. Работа выполнена с использованием некоммерческих модельных штаммов *Escherichia coli*, но ее результаты были применены при конструировании продуцентов фенилаланина, внедрённых фирмой Аджиномото (Япония) в действующее мировое биотехнологическое производство.

Диссертация В.Г. Дорошенко построена по традиционному плану и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список использованной литературы. Работа

изложена на 210 страницах, материал иллюстрирован 46 рисунками и 28 таблицами. Библиографический указатель включает 308 цитированных работ.

Обзор литературы содержит подробный анализ информации по каждому из направлений экспериментальной работы. Автор суммированы данные, касающиеся пути биосинтеза фенилаланина и принципов достижения суперпродукции этой аминокислоты в *E. coli*, рассмотрены механизмы утилизации сахарозы клетками энтеробактерий и механизмы экспорта аминокислот из бактериальных клеток, кроме того описаны характеристики использованных в работе регуляторных систем кишечной палочки: Pho-регулона и системы контроля уровня клеточных белков с помощью протеолиза. Содержание обзора точно соответствует экспериментальной части работы, дополняет ее и, несомненно, важно для ее понимания. Проведенный анализ литературы, с одной стороны, обосновывает предложенные автором новые пути увеличения продукции ароматических аминокислот, а, с другой стороны, является, по существу, элементом обсуждения экспериментальных результатов. Обзор написан хорошим языком, отражает современное состояние исследований и позволяет лучше оценить значимость полученных автором диссертации результатов. В то же время такая строгая привязка к экспериментальной работе, на мой взгляд, приводит к тому, что обзор литературы производит впечатление связанного общей идеей набора фрагментов. Каждая из таких частей достаточно глубоко проработана и представляет несомненную ценность для исследователей, интересующихся конкретными вопросами. Однако было бы полезно в дополнение к этому показать более широкую картину общих проблем и перспектив создания оптимизированных продуцентов ароматических аминокислот. Такой взгляд позволил бы читателю, не специализирующемуся в разработке бактериальных продуцентов, лучше понять место представленной диссертационной работы в общем пуле работ, посвященных данной тематике.

Глава «Материалы и методы» написана достаточно подробно и демонстрирует широкий арсенал методов микробиологии, молекулярной биологии и биохимии, которыми владеет автор.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из нескольких разделов. В основном они соответствуют предложенным и опробованным автором новым стратегиям усовершенствования продуцентов ароматических аминокислот. Первый раздел описывает исследования системы утилизации сахарозы и создание модельных продуцентов триптофана и фенилаланина на основе клеток *E. coli*, способных использовать сахарозу в качестве источника углерода. Это стало возможным, благодаря

искусственной интеграции в хромосому кластера генов *scr*, наличие которого, как было продемонстрировано автором, является достаточным для обеспечения роста клеток на средах, содержащих этот дисахарид. Полученный результат имеет важное практическое значение, поскольку сахароза, прежде всего вследствие ее доступности и дешевизны, является чрезвычайно перспективным сырьём для микробиологического производства.

Дальнейшее развитие работы было связано с разработкой более специфических для получения ароматических аминокислот подходов. Это потребовало создания модельных штаммов продуцентов фенилаланина, тирозина и триптофана, а также гистидина. Такие продуценты были сконструированы на основе штамма *E. coli* MG1655 путем геномного редактирования с использованием методов рекомбинационной инженерии. Введенные генетические модификации хромосомы были спланированы на основе данных о путях синтеза конкретных аминокислот и механизмах их регуляции, что во всех случаях привело к повышенной продукции целевых аминокислот.

Следующим этапом работы стала оптимизация продуцентов ароматических аминокислот путем повышения устойчивости к синтезируемому продукту за счёт увеличения эффективности его экспорта из бактериальной клетки. Основным объектом в этой части исследования стал ген экспортёра ароматических аминокислот *yddG*. Автором была проведена молекулярно-генетическая характеристика этого гена и показано, что токсичность фенилаланина при ферментации может быть преодолена с помощью оверэкспрессии *yddG*. Для осуществления повышенной продукции белка-экспортёра в хромосому бактерии была введена дополнительная копия его гена под управлением сильного промотора, что позволило существенно увеличить накопление ароматических аминокислот, прежде всего фенилаланина, в культуральной жидкости. Таким образом, автором был разработан новый подход для увеличения продукции ароматических аминокислот, который в дальнейшем был использован при создании промышленных продуцентов. Следует отметить также, что ген *yddG*, по-видимому, был одним из первых генов кишечной палочки, оптимизацию экспрессии которого проводили, непосредственно модифицируя бактериальную хромосому.

Еще одним разработанным автором новым подходом для оптимизации бактериальных продуцентов стала инактивация конкурирующего пути биосинтеза, базирующаяся на направленном протеолизе продукта искусственного аллеля целевого гена. На основе этого подхода был впервые создан продуцент фенилаланина на основе *E. coli*, который не нуждался в тирозине и при этом в процессе ферментации его не накапливал. Эта стратегия, реализованная через интеграцию в целевой белок сигнала

внутриклеточной деградации АТФ-зависимыми протеазами, была в дальнейшем успешно реализована в промышленном продуценте.

Две другие, опробованные в ходе выполнения диссертационной работы стратегии, оказались не столь успешными с точки зрения повышения продукции ароматических аминокислот клетками *E. coli*. В то же время данные, полученные автором при исследовании возможности применения бифункциональной хоризматсинтазы из *S. cerevisiae*, могут быть полезны в других биотехнологических приложениях. Что касается идеологии метаболической регуляции, которая была реализована в работе на примере использования Pho-регуляции для получения фенилаланина, то это, чрезвычайно перспективное направление, и дальнейшее развитие этого подхода, несомненно, приведет к значимым с практической точки зрения результатам.

Таким образом, диссертантом получен широкий спектр оригинальных экспериментальных данных, большинство из которых являются приоритетными и обладают большой практической ценностью, что подтверждается 10 патентами в списке публикаций автора. Основным итогом работы состоит в создании набора подходов для увеличения продукции ароматических аминокислот бактериальными клетками. Принципиальным с точки зрения получения промышленных продуцентов является то, что разработанные В.Г. Дорошенко подходы базируются на непосредственном редактировании бактериальной хромосомы. Не вызывает сомнений, что эти подходы могут быть применены при конструировании микробных продуцентов самых разных полезных соединений, а также в исследовательской практике.

Естественно, диссертационная работа В.Г. Дорошенко не лишена некоторых недостатков. Прежде всего, хотелось бы отметить, что 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.

Остальные замечания носят более конкретный характер. Так, представляя количественные результаты, автор далеко не всегда приводит значения ошибок эксперимента (например, в таблицах 3.1, 3.5, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.12, 3.14, 3.16, 3.18 и на рисунках 3.6, 3.7, 3.11, 3.13, 3.18, 3.19, 3.22, 3.23, 3.24). В связи с этим возникает вопрос об обоснованности сделанных автором интерпретаций различий между полученными значениями, так как эти различия во многих случаях не слишком велики, а также вопрос о том, были ли в ходе исследований выполнены необходимые технические и биологические повторы экспериментов. Кроме того, в тех случаях, когда ошибки представлены, отсутствуют пояснения, какому статистическому показателю соответствуют приведенные значения, что также затрудняет толкование количественных различий.

В разделе «Материалы и методы» при описании условий центрифугирования следовало бы указывать, помимо скорости вращения ротора (об/мин), еще и радиус ротора. Более корректным было бы заменить данные параметры, как обычно принято, фактором разделения – отношением центробежного ускорения к ускорению свободного падения (g).

Некоторое недоумение вызывает то, что в тексте встречается три варианта написания слова «секвенирование», кроме общепринятого (стр. 88 и 98), используются «сИквенирование» (стр. 82, 83 и 84) и «секВинирование» (стр. 82 и 107). В тексте также встречаются другие стилистические и грамматические ошибки и опечатки, но их число не велико.

В то же время следует подчеркнуть, что имеющиеся недостатки не являются принципиальными и не влияют на высокую оценку работы. Диссертация В.Г. Дорошенко является законченным самостоятельным научным исследованием, выполненным на самом высоком экспериментальном и теоретическом уровне. Полученные результаты не вызывают сомнения. Выводы обоснованы, полностью отражают результаты исследования и согласуются с поставленными задачами. Основные научные результаты диссертации опубликованы в российских и зарубежных рецензируемых научных журналах, защищены патентами, а также представлены на научных конференциях. Автореферат полностью отражает содержание выполненной диссертационной работы.

