

Отзыв официального оппонента

на диссертацию В.Г. Дорошенко «Направленные изменения хромосомы *Escherichia coli* для системного конструирования продуцента *L*-фенилаланина», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Биотехнологическое производство природных аминокислот, исчисляемое в мире миллионами тонн ежегодно, имеет исключительно важное значение для современной цивилизации. Среди них незаменимая аминокислота – *L*-фенилаланин – которая широко используется в пищевой, фармацевтической промышленности, а также в агропромышленном секторе, входит в десятку аминокислот, наиболее востребованных на рынке. В этой связи рецензируемая диссертационная работа В.Г. Дорошенко, направленная на совершенствование методов получения эффективных продуцентов фенилаланина, решает актуальную задачу современной биотехнологии.

Следует особо подчеркнуть, что значимость данной диссертационной работы не ограничивается созданием соответствующих новых или усовершенствованием известных методов метаболической инженерии и молекулярной генетики микробов. В процессе выполнения работы автору удалось выдвинуть и реализовать на практике новую концепцию конструирования бактериальных штаммов-продуцентов аминокислот, основанную на направленной модификации их генома. Универсальное значение уже внедренных в практику новых методов генетических модификаций микроорганизмов, которые могут быть использованы и в других областях метаболической инженерии, позволяют говорить о создании автором диссертации нового направления в конструировании бактериальных штаммов-продуцентов низкомолекулярных метаболитов.

Представленные в диссертации результаты исследования подчинены строгой логике. Прежде всего диссертанту удастся решить важную задачу получения стабильных бактериальных штаммов-продуцентов аминокислот, способных использовать сахарозу в качестве единственного источника углерода. При этом расчет делался на дешевое и доступное сырье – мелиссу – побочный продукт сахарного производства. Поскольку ограниченная растворимость фенилаланина лимитировала его накопление в клетке, дальнейшее увеличение производительности штаммов было достигнуто путем направленного экспорта аминокислоты во внеклеточную среду через мембраны с использованием специфического белкового переносчика. В биосинтезе фенилаланина и тирозина используется общий предшественник – префеновая кислота, поэтому усиление продукции первого могло быть достигнуто ослаблением пути образования второго. Эта

задача была блестяще решена В.Г. Дорошенко за счет регулируемой деградации фермента, осуществляющего биосинтез тирозина – хоризматсинтазы. Остающейся внутриклеточной активности этого фермента было достаточно для обеспечения жизнедеятельности бактериальных клеток без добавления тирозина в питательную среду. Такого рода подходы к получению промышленных бактериальных штаммов-продуцентов аминокислот, основанные на отказе от максимизации отдельных этапов биосинтеза в пользу их сбалансированной оптимизации, позволило автору получить продуценты фенилаланина с отличными биотехнологическими характеристиками.

Диссертация В.Г. Дорошенко, изложенная на 210 страницах, содержит 46 рисунков и 28 таблиц и построена по стандартному плану, то есть состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, а также перечня использованных сокращений и обозначений. Список цитированной литературы содержит ссылки на 308 оригинальных источников, из которых 31 – на русском языке.

Обзор литературы, написанный, как и вся диссертация, хорошим литературным языком, содержит всю информацию, необходимую для понимания основной части работы. В нем с исчерпывающей полнотой освещены метаболические пути биосинтеза фенилаланина в *E. coli*, основные этапы их регуляции, а также рассмотрены подходы, ранее использованные для его биотехнологической продукции бактериальными клетками. Кроме того, в обзоре литературы уделено внимание основным теоретическим проблемам, которые были решены при выполнении экспериментальной части диссертации. К недостатку обзора литературы можно отнести отсутствие заключения, которое бы на основании изложенного материала еще раз сформулировало задачи экспериментальной части диссертации.

Раздел «Материалы и методы» детально описывает методики, использованные автором при постановке экспериментов. Этот раздел показывает, что В.Г. Дорошенко профессионально владеет современными методами биохимии, микробиологии, молекулярной биологии и генетики, а их детальное описание будет способствовать воспроизведению полученных результатов.

Создание высокоэффективных штаммов-продуцентов фенилаланина было начато диссертантом издалека с получения бактериальных штаммов, способных использовать дешевую сахарозу в качестве единственного источника углерода. При решении этой задачи диссертант применила известный транспозон Tn2555, который содержал в своем составе кластер генов *scr*, обеспечивающих утилизацию сахарозы. В ходе проведения этой серии экспериментов были сконструированы плазмиды с данным кластером генов, а

также предложен и экспериментально подтвержден молекулярный механизм транспозиций мобильных элементов, несущих этот кластер. Выполнение данной части работы позволило не только использовать полученные промежуточные конструкции для интеграции *scr*-генов в бактериальные хромосомы с целью их последующей стабильной экспрессии, но и решить фундаментальные вопросы молекулярной структуры *src*-оперонов и особенностей их внутриклеточного перемещения. Эти эксперименты являются одним из многих примеров того, каким образом автор в своей диссертационной работе решает не только сугубо прикладные задачи, но и обогащает молекулярную генетику микроорганизмов решениями ее фундаментальных проблем. Один из полученных в итоге и тщательно картированных штаммов-продуцентов аминокислот, способных утилизировать сахарозу, был использован далее для оптимизации продукции фенилаланина.

У *E. coli* оперон *pheL-pheA*, контролирующий последний этап биосинтеза фенилаланина ориентирован навстречу оперону *apoF-tyrA*, обеспечивающему биосинтез тирозина и отделен от него двухсторонним ρ -независимым терминатором транскрипции. Поэтому транскрипция этих двух оперонов сопровождается РНК-интерференцией – столкновением молекул РНК-полимераз, перемещающихся навстречу друг-другу. Автором было показано, что подавление транскрипции этого кластера в одном из направлений, как следствие введения хромосомных делеций, сопровождается усилением транскрипции противостоящих генов и повышением уровня синтеза соответствующей аминокислоты. При этом продуцент становится ауксотрофным по другой аминокислоте и растет только в ее присутствии, что повышает себестоимость конечного продукта. Проблема ауксотрофности такого рода штаммов была изящно решена В.Г. Дорошенко. Для этого в другой генетический локус бактериальной хромосомы делеционного мутанта был введен модифицированный ген *tyrA*, который кодировал измененную по своему С-концу префенатдегидрогеназу TyrA. Введение специфической последовательности аминокислот (дегрона), контролирующей скорость протеолитического разрушения белка, сопровождалось ускоренной деградацией фермента и понижением внутриклеточного уровня синтезируемого тирозина до значений, еще обеспечивающих нормальный рост бактерий в отсутствие экзогенного тирозина. Это позволило существенно снизить его содержание в препаратах фенилаланина в качестве нежелательной примеси, что облегчало дальнейшую очистку целевой аминокислоты.

Одним из существенных изменений генотипа штаммов *E. coli*, продуцирующих фенилаланин, которое позволило автору диссертации заметно усилить продукцию этой аминокислоты, было введение в хромосомы бактериальных штаммов дополнительной

копии гена транспортера аминокислот YddG под контролем сильного промотора. Это сопровождалось снижением внутриклеточной концентрации фенилаланина и, соответственно, его токсичности за счет экспорта во внеклеточную питательную среду. В результате таких изменений генотипа продуцирующих штаммов их производительность усиливалась, по крайней мере, в три раза.

На заключительном этапе работы В.Г. Дорошенко была оптимизирована экспрессия гена *apoG4*, кодирующего ДАНР-синтазу, которая функционирует в начале пути биосинтеза шикимовой кислоты и контролирует поток углерода в общий путь биосинтеза ароматических аминокислот. Поскольку активность этого фермента заметно снижалась во второй фазе ферментации, а основная продукция фенилаланина происходила в стационарной фазе, была предпринята успешная попытка поместить этот ген под контроль промоторов Pho-регулона, которые активны в стационарной фазе роста бактериальных клеток в условиях недостатка неорганического фосфата в питательной среде. Действительно, введение в хромосому штаммов-продуцентов фенилаланина мутантного гена *apoG4*, кодирующего ДАНР-синтазу, устойчивую к действию фенилаланина, под контролем промоторов Pho-регулона, существенно повышало накопление фенилаланина в стационарной фазе.

Представленные автором результаты не вызывает принципиальных замечаний. Решение любой научной проблемы может быть достигнуто разными путями, и их выбор определяется имеющимися в распоряжении диссертанта возможностями. Поэтому, в данном случае, не имеет смысла критиковать выбранные подходы и говорить о чем-то теоретически более эффективном. Успешное завершение работы В.Г. Дорошенко подтверждено многочисленными публикациями, в том числе Российскими и зарубежными патентами, а также самими промышленными штаммами, внедренными в биотехнологическое производство. 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.

Подводя итог всему сказанному, можно заключить, что в результате выполнения объемной и высококвалифицированной работы диссертанту удалось создать и внедрить в биотехнологическую практику новое направление в конструировании бактериальных штаммов-продуцентов, основанное на модульной генно-инженерной модификации их хромосом. Это позволило получать стабильные, безплазмидные и безмаркерные штаммы, экспрессирующие необходимые гены в новом генетическом окружении, что сопровождалось значительным улучшением их продуктивности. Значение исследований,

проведенных В.Г. Дорошенко, не ограничивается сугубо прикладными достижениями, но вносит существенный вклад в понимание фундаментальных механизмов контроля отдельных путей метаболизма бактерий и является заметной вехой на пути развития метаболической инженерии.

Достоверность полученных результатов и сделанных в диссертации выводов не вызывает сомнений. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация достаточно полно отражена в патентах и научных статьях, опубликованных автором в ведущих российских и зарубежных журналах, результаты работы доложены на отечественных и международных конференциях.

Диссертация В.Г. Дорошенко «Направленные изменения хромосомы *Escherichia coli* для системного конструирования продуцента *L*-фенилаланина» полностью отвечает требованиям "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор Дорошенко Вера Георгиевна заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, д.б.н., профессор

Патрушев Лев Иванович

Адрес: , 117997 г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая 16/10
Тел.: +7(906)736-93-55
Эл. адрес: levpatrushev0@gmail.com

Подпись Л.И. Патрушева заверяю:
Заместитель директора ИБХ РАН по научной работе,
доктор физ.-мат. наук, профессор
Р.Г.Ефремов



23 апреля 2021 г.