

## 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  $\lambda$ , 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 кратко 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 *yddG*. 4. Получение продуцента фенилаланина TyrA<sup>+</sup>, 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 Заключение** 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  
г. Москва, ул. Губкина, 3. ИОГен РАН,  
[abilev@vigg.ru](mailto: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.

