

ОТЗЫВ

на диссертационную работу Плехановой Натальи Сергеевны «Влияние процессов Nε-ацетилирования белков на регуляцию метаболических потоков в *Escherichia coli* штаммах-продуцентах аминокислот» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология.

Актуальность темы диссертационного исследования

Диссертационная работа, представленная на тему «Влияние процессов Nε-ацетилирования белков на регуляцию метаболических потоков в *Escherichia coli* штаммах-продуцентах аминокислот», является актуальным вкладом в область молекулярной биологии, биохимии и биотехнологии. В условиях растущей потребности в импортозамещении аминокислот как необходимых биодобавок в пищевой промышленности, медицине и сельском хозяйстве; разработка эффективных методов биотехнологического производства аминокислот является крайне актуальной задачей.

С учетом недостатка ресурсов и повышения цен на традиционные источники углерода, поиск новых подходов к производству микробиологических продуктов становится крайне важным. Работа направлена на оптимизацию биосинтеза аминокислот, что делает ее вклад значительным для развития научной и производственной практики.

Метаболическая регуляция посредством энзиматического ацетилирования может быть консервативным механизмом у разных организмов.

В работе показано, что энзиматическая активность ключевых ферментов, участвующих в конверсии источников углерода в целевые продукты, может определяться как энзиматическим, так и не энзиматическим ацетилированием.

Предложенный в работе подход совершенствования штаммов-продуцентов аминокислот за счет усиления энзиматического ацетилирования ферментов центрального метаболизма является оригинальным и ранее в литературе описан не был. В работе также показано, что не энзиматическое ацетилирование может приводить к снижению активности ключевых ферментов, и использование процесса их деацетилирования ведет к увеличению продукции аминокислот.

Цели и задачи исследования

Цель работы, заключающаяся в изучении влияния Nε-ацетилирования белков на регуляцию метаболических потоков в штаммах-продуцентах *E. coli*, четко сформулирована и соответствует современным трендам в биотехнологии. Задачи исследования логично вытекают

из основной цели и охватывают как теоретические, так и практические аспекты, что свидетельствует о комплексном подходе автора к исследованию.

Научная новизна и значимость

Научная новизна представленных результатов состоит в том, что автор показал зависимость профиля ацетилирования одного из ключевых ферментов гликолиза — ГАФД- от генотипа штамма, в котором данный белок был синтезирован. Было установлено, что способны ацетилироваться ферментативно те аминокислотные остатки лизина, которые не подвержены деацетилированию деацетилазой CobB. Данное наблюдение позволяет выдвинуть гипотезу об ацетилировании некоторых остатков лизина в процессе сборки активных форм ферментов (фолдинга). Показано, как процессы ацетилирования и деацетилирования влияют на продукцию L-треонина.

Достоверность результатов работы: полученные данные базируются на всестороннем анализе приведенных в работе множественных экспериментов. Все данные подтверждают достоверность сделанных выводов.

По теме диссертации было опубликовано: 10 научных работ, отражающих основные результаты работы, в том числе 5 в изданиях, индексируемых в Web of Science и/или Scopus, а также тезисы докладов на научных конференциях. Автореферат полностью отражает основные научные результаты диссертации.

Практическая значимость

Практическая значимость работы выражается в возможности разработки новых штаммов-продуцентов, способных эффективно усваивать различные углеродные источники и повышать выход L-аминокислот. Это имеет прямое значение для промышленности, так как позволяет снизить затраты и повысить эффективность производственных процессов. Результаты работы могут быть использованы для оптимизации существующих технологий и создания новых.

Методология исследования

Методы, использованные в работе, включая лабораторную адаптивную эволюцию, генно-инженерные модификации хромосомальной ДНК, а также примененные биохимические методы являются современными и соответствуют задачам исследования. Автор использует простую в исполнении и менее трудо- и ресурсозатратную пробирочную ферментацию для оценки продуктивности штаммов на различных углеродных источниках, а также использует математические методы для статистической обработки полученных результатов, что обеспечивает достоверность полученных данных.

Структура и качество изложения

Во «Введении» в строгом соответствии с требованиями ВАК, обоснована актуальность работы, представлены цели и задачи работы, научная новизна и практическая ценность выполненных исследований.

Структура диссертационной работы логична и последовательно раскрывает основные аспекты работы. Язык изложения понятен и доступен, что облегчает восприятие материала. Обзор литературы включает в себя четыре главы. Первая глава посвящена областям применения и способам производства аминокислот. Подробно описаны современные методы создания штаммов-продуцентов аминокислот с учетом анализа клеточных метаболических путей. Вторая глава посвящена анализу особенностей штаммов *E. coli* линий K12 и В. В третьей главе подробно описано ацетилирование белков как способа регуляции метаболизма бактериальных клеток, а также рассмотрены механизмы реализации данных процессов у бактерий. Четвертая глава посвящена актуальной проблеме – способам снижения накопления ацетата в ходе ферментационных процессов.

Раздел «Материалы и методы» содержит детальное описание методов, использованных в работе, также содержит и ссылки на оригинальные работы, что позволяет воспроизвести эти методики другим исследователям. Следует отметить, что автор использует широкий круг методик: микробиологических, в том числе специальных методик по работе с бактериями, генно-инженерных, биоинформатических. Особенно впечатляющим является использование подхода белок-белковых взаимодействий. Все это характеризует диссертанта как универсального ученого с широким диапазоном действия.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из шести частей, в которых подробно обсуждаются полученные результаты. Показано, что усиление процесса ферментативного ацетилирования на начальном этапе ферментации положительно влияет на выход треонина В результате ферментационного процесса на среде с глюкозой продуктивности штамма увеличивается на 8% по сравнению с продуктивностью исходного штамма, а при использовании в качестве источника углерода ксилозы и сахарозы на 33% и 26% соответственно.

Соискателем описан комплексный подход, основанный на создании штамма-продуцента L-треонина *Escherichia coli*, устойчивого к высоким концентрациям ацетата, с помощью адаптивной лабораторной эволюции и последующего индуцибельного повышения уровня экспрессии гена, кодирующего деацетилазу. Проверка штаммов на ферментационных средах с глюкозой, ксилозой и сахарозой показала значительное увеличение продуктивности. На ферментационных средах с глюкозой продуктивность увеличилась на 15% для исходного штамма-продуцента треонина и на 29% для устойчивого к ацетату штамма ТА-81, а на ферментационных средах с сахарозой +14% и +15% соответственно. В случае роста на ксилозе положительный эффект от усиления деацетилазы наблюдался только для штамма ТА-81 (+26%).

С использованием подходов прецизионного геномного редактирования, соискателем были получены производные штамма *E. coli* дикого типа MG1655 с инактивированной природной копией гена *gapA*, кодирующего ГАФД, и несущие интегрированные в локус *ubhB* мутантные варианты гена - *gapA*^{D34K} или *gapA*^{D34AG188TP189K}. Также, с привлечением традиционных генно-инженерных методов, соискателем были сконструированы плазмиды, производные экспрессионного вектора pET22, несущие гены *E. coli* *patZ* и *cob*, кодирующие пептидиллизин N-ацетилтрансферазу и НАД⁺-зависимую деацетилазу.

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* соискатель четко продемонстрировали влияние внесения в молекулу ГАФД дополнительных остатков лизина на изменение активности фермента в результате его ацетилирования и деацетилирования.

Также определено влияние процессов ацетилирования Nε-лизина белков на метаболизм часто используемых штаммов *E. coli* MG1655 и BL21(DE3), а также штаммов-продуцентов аминокислот L-треонина и L-пролина. Продемонстрировано, что профиль ацетилирования одного из ключевых ферментов гликолиза — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) — зависит от штамма, в котором данный белок был синтезирован.

Соискателем показано, что удаление генов, участвующих в метаболизме ацетата и ацетилировании ε-аминогруппы лизина белков влияет на метаболизм штаммов-продуцентов и на продуктивность целевых аминокислот. Подходы, связанные с модулированием ацетилирования белков, могут быть полезными в метаболической инженерии при создании более эффективных штаммов-продуцентов.

Содержание автореферата

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

Замечания и вопросы

1. Имеются неточности в тексте, например:

- Первое появление в тексте ГАФД не расшифровано, при этом расшифровка появляется существенно позже в главе 1.8. Гены написаны курсивом, это правильно, но для *fruR* и *arpA* сделано исключение - обычным шрифтом, а ген *cobB* – встречается и так, и так. Цикл трикарбоновых кислот обозначается то ТЦК, то ТСА, надо что-то одно было выбрать.
- Родовые названия) полностью пишутся в тексте только один раз, когда они встречается впервые. Например, *Escherichia* встретилась 7 раз.

- В литобзоре: «В 1907 году Кикинаэ Икеда начал исследования усилителя вкуса. Вскоре он обнаружил, что это глутамат натрия (Kurihara, 2009).» Разница между ссылками 102 года.
- Там же глава «1.4 Методы создания штаммов-продуцентов аминокислот, сосредоточенные на анализе метаболических путей» очень короткая и не содержит ссылок. Может это общее название для нескольких последующих глав литобзора?
- В литературном обзоре полностью отсутствуют иллюстрации.
- Для рисунка 9 дано неполное описание. Не описано, что помечено желтым цветом.

2. Вопрос по оформлению. Обычно список опубликованных автором статей (а тем более тезисов) в тексте диссертации не приводят. Список, как правило, приводится в автореферате. Ссылки в тексте диссертации на свои статьи тоже не делаются, только если это статьи, материалы, которых не вошли в диссертацию. Это какие-то новые правила оформления диссертаций?

3. В материалах и методах нет описания того, как определяли концентрацию целевых аминокислот. В главе «Оценка накопления L-аминокислот...», даны способы ферментаций, но не методы определения продукта.

4. В работе много усилий посвящено исследованию ацетилирования ГАФД, однако эксперимента, проверяющего влияние генов *patZ* и *cobB* на продукцию аминокислот на фоне мутации по *gapA*. Почему?

5. В 1 и 2 выводах делается утверждение, что своевременная регуляция ферментативного ацетилирования и деацетилирования приводит к существенному увеличению продуктивности штамма (до 30%). Однако в 6 выводе говорится, что мутации по генам ацетилазы и деацетилазы не влияют на продуктивность. Получается несогласованность в выводах.

Заключение

Отмеченные замечания не снижают общей значимости и качества диссертационного исследования Плехановой Н.С. «Влияние процессов N_ε-ацетилирования белков на регуляцию метаболических потоков в *Escherichia coli* штаммах-продуцентах аминокислот». Диссертационная работа имеет значительный научный и практический потенциал. Результаты, полученные в ходе исследования, представляют интерес для дальнейшего изучения и внедрения в промышленную практику. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.6. – Биотехнология, а сама диссертация отвечает требованиям, предъявляемым к диссертациям на

соискание ученой степени кандидата биологических наук, в соответствии с пунктами 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденном постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 26 сентября 2022 г. № 1690),

Таким образом, соискатель Плеханова Наталья Сергеевна достойна присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук (специальность 03.02.07 - генетика), главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной генетики Физтех-школы физики и исследований им. Ландау Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)».

141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок, д.9.

тел.: +7 (905) 562-29-24

E-mail: manukhovi@mail.ru

Манухов Илья Владимирович

«25» ноября 2024 г.

Подпись доктора биологических наук, главного научного сотрудника, заведующего лабораторией молекулярной генетики, заместителя заведующего кафедры биофизики

Манухова Ильи Владимировича удостоверяю:

Учёный секретарь МФТИ



Евсеев Евгений Григорьевич