

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.02**  
**по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание**  
**ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного**  
**учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные**  
**основы биотехнологии» Российской академии наук» по диссертации**  
**Плехановой Натальи Сергеевны «Влияние процессов N<sub>ε</sub>-ацетилирования**  
**белков на регуляцию метаболических потоков в *Escherichia coli* штаммах-**  
**продуцентах аминокислот» на соискание ученой степени кандидата**  
**биологических наук.**

**Аттестационное дело №**  
**дата защиты 25 декабря 2024 г., протокол №16**

Решение диссертационного совета от 25 декабря 2024 г. № 16 о присуждении  
Плехановой Наталье Сергеевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени  
кандидата биологических наук

Диссертация **Плехановой Натальи Сергеевны «Влияние процессов N<sub>ε</sub>-ацетилирования белков на регуляцию метаболических потоков в *Escherichia coli* штаммах-продуцентах аминокислот»** по специальности 1.5.6. «Биотехнология» принята к защите 10 октября 2024 г. протокол № 13 диссертационным советом 24.1.233.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2. Совет утвержден Министерством образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России) приказом №205 от 16 марта 2017 г., от 03.06.2021 №561/нк, с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 12 октября 2022 года № 1162/нк.

**Соискатель Плеханова Наталья Сергеевна**, 1993 года рождения, гражданка РФ, в 2018 г. окончила магистратуру ФГБОУ ВО РХТУ им. Д.И. Менделеева по направлению подготовки 18.04.01 «Химическая технология». В период 2018-2022 гг. проходила обучение в очной аспирантуре Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки. С 2023 г. работает младшим научным сотрудником в лаборатории молекулярной биотехнологии Института биохимии А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН). Диссертационная работа Плехановой Натальи Сергеевны «Влияние процессов N<sub>ε</sub>-ацетилирования белков на регуляцию метаболических потоков в *Escherichia coli* штаммах-продуцентах аминокислот» выполнена в лаборатории молекулярной биотехнологии Института биохимии А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН.

**Научный руководитель** – Федоров Алексей Николаевич, доктор биологических наук, директор Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

### **Официальные оппоненты:**

**Муронец Владимир Израилевич**, доктор биологических наук, специальность 03.01.04 Биохимия, заведующий отделом биохимии животной клетки НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования МГУ имени М.В. Ломоносова,

**Манухов Илья Владимирович**, доктор биологических наук, специальность 03.02.07 Генетика, заведующий лабораторией молекулярной генетики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)» дали положительные отзывы.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тульский государственный университет» (ТулГУ) в своем положительном отзыве, подписанным Понаморовой О.Н., доктором химических наук, заведующим кафедрой биотехнологии ТулГУ, и утвержденном проректором по научной работе ТулГУ, доктором технических наук, профессором Воротилиным М.С., указала, что диссертационная работа Плехановой Н.С. является комплексным исследованием на стыке нескольких взаимосвязанных областей знаний (биохимии, молекулярной биологии, микробиологии, биотехнологии) и имеет большое научное и практическое значение. Диссертационная работа Плехановой Н.С., представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, полностью удовлетворяет требованиям ВАК Минобрнауки России в соответствии с п. 9-11, 13-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842 (в действующей редакции), а ее автор, Плеханова Н.С., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология».

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области биотехнологии, биохимии, молекулярной биологии и генетики. Так, доктор биологических наук Муронец Владимир Израилевич известен своими работами в области изучения глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и посттрансляционных модификаций белков. Доктор биологических наук Манухов Илья Владимирович известен своими работами в области метаболической инженерии, а также создания штаммов-продуцентов биологически активных веществ, в том числе и аминокислот. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в цитируемых российских и зарубежных журналах.

Выбор ведущей организации связан с тем, что в учреждении проводятся исследования в области микробных биотехнологий, биохимии и молекулярной биологии, что также подтверждается наличием соответствующих публикаций.

Высокая квалификация оппонентов и ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

### **Публикации:**

Основные результаты диссертационной работы изложены в 5 статьях в рецензируемых научных изданиях, которые удовлетворяют требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842:

1. Slivinskaya E.A., **Plekhanova N.S**, Altman I.B., Yampolskaya T.A. Engineering of *Escherichia coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with dual NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup>

- cofactor specificity for improving amino acid production // *Microorganisms*. – 2022. – V. 10. – №. 5. – art. 976.
2. **Plekhanova N.S.**, Altman I.B., Yurkova M.S., Fedorov A.N. The Effects of Nε-Acetylation on The enzymatic activity of *Escherichia coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2023. – V. 59. – №. 6. – P. 778-785.
  3. **Плеханова Н.С.**, Альтман И.Б., Лившиц В.А., Юркова М.С., Федоров А.Н. Ацетилирование белков у бактерий как способ регуляции метаболизма клетки // *Биотехнология*. – 2023. – Т.39. – № 5. – С. 14-23.
  4. **Плеханова Н.С.**, Лившиц В.А., Юркова М.С., Федоров А.Н. Влияние ацетилирования и деацетилирования белков на метаболизм штаммов *Escherichia coli* // *Биотехнология*. – 2024. – Т.40. – № 3. – С. 36-46.
  5. **Плеханова Н.С.**, Лившиц В.А., Хижняк Т.В., Юркова М.С., Федоров А.Н. Влияние процесса деацетилирования на продукцию треонина штаммом-продуцентом *Escherichia coli* // *Биотехнология*. – 2024. – Т.40. – № 4. – С. 1-11.

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на международных и российских конференциях: 1) 3-й Российский микробиологический конгресс (Псков, Россия, 2021 г.); 2) XI Международная научно-практическая конференция "Биотехнология: наука и практика" (2023 г., п. Новомихайловский, Россия); 3) XIII Международная научно-практическая конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (2023 г., Минск, Республика Беларусь); 4) Международная научная конференция молодых учёных «Наука и инновации» (2023 г., Ташкент, Узбекистан); 5) XII международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (2024 г., п. Новомихайловский, Россия).

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

**На диссертацию поступили следующие отзывы:**

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Муронца В.И.**, (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

1. Формулировка цели работы представляется не совсем удачной: целью работы, к сожалению, не может быть «изучение»;
2. Вторая статья в списке работ автора опубликована в хорошем российском журнале и следует давать ссылку на русском языке;
3. Введения в каждом разделе слишком обширные и часто повторяют обзор литературы;
4. В таблицах следовало бы указать изменения в процентном выражении (таблицы 4 и 5), чтобы легче было их анализировать;
5. Взаимосвязь инактивации фермента и модификации остатка лизина 184 следовало бы изложить более подробно;
6. Формулировка последнего вывода (номер 6) не очень четкая;

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Манухова И.В.**, (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

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 *agrA* сделано исключение - обычным шрифтом, а ген *sovB* – 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 встречаются впервые. Например, *Escherichia* встретила 7 раз.

- В литобзоре: «В 1907 году Кикунэ 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 *sovB* на продукцию аминокислот на фоне мутации по *garA*. 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.

**Отзыв ведущей организации** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тульский государственный университет» – отзыв положительный. Некоторые замечания и вопросы:

1. Несмотря на значительный список цитируемой литературы (220 источников), только 10% ссылок на научные публикации за последние 5 лет, и не более 10 источников (включая статьи автора) – за последние 3 года. Чем обусловлено это обстоятельство? Возможно, пока не очень много исследовательских групп занимаются этой тематикой из-за того, что ацетилирование у прокариот было обнаружено недавно?

2. Одно из положений научной новизны, сформулированное автором звучит так: «Обнаружено, что удаление генов, участвующих в метаболизме ацетата и ацетилировании  $\epsilon$ -аминогруппы лизина белков влияет на метаболизм штаммов-продуцентов и на продуктивность целевых аминокислот». В тоже время в выводе содержится противоположное заключение: «Установлено, что ферменты, участвующие в процессах ацетилирования, не являются жизненно важными для клеток *E. coli*, однако их делеции

приводят к снижению скорости роста и накоплению биомассы штаммами, однако в случае штаммов-продуцентов аминокислот не приводят к снижению уровня продукции L-треонина и L-пролина». Как автор объяснит это противоречие?

3. Название Главы VIII «Влияние ферментов, участвующих в процессах ацетилирования на клеточный метаболизм и продукцию аминокислот» неудачное, так как в названии главы VI «Влияние процесса ферментативного ацетилирования на продукцию L-треонина штаммом-продуцентом *Escherichia coli*» тот же предмет исследования. Как автор объяснит это?

4. Диссертантом проделана большая теоретическая и экспериментальная работа, получен большой массив результатов. Для лучшего понимания целостности работы, наглядного представления взаимосвязи полученных результатов и найденных закономерностей автору следовало изложить логику исследования и полученных результатов в виде блок-схемы, что значительно упростило бы анализ и обобщение информации для научного сообщества.

5. По тексту иногда встречаются опечатки, чего, вероятно, очень сложно избежать в любой работе.

#### **На автореферат поступили положительные отзывы. Отзывы прислали:**

1. Красноштанова А.А., д.б.н., профессор кафедры Биотехнологии ФГБОУ ВО РХТУ им. Д.И. Менделеева. Замечание:

а) желательно было уточнить на основе проведенных исследований, на каком субстрате целесообразно было бы проводить культивирование использованных в работе штаммов с целью достижения максимального выхода аминокислот.

б) в ряде таблиц (3-6, 8, 9) приведенная точность экспериментальных данных не всегда соответствует точности указанного доверительного интервала.

2. Прасолова О.В., к.вет.н., в.н.с. отдела молекулярной биологии, отделения биотехнологии ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГБУ «ВГНКИ»)). Замечаний нет.

3. Фоменко И.А., к.т.н., доцент кафедры биотехнологии и биоорганического синтеза ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)». Замечание: «в выводе автореферата диссертации представлено заключение о повышении продуктивности штамма-продуцента L-треонина от 14 до 30%, однако не продемонстрировано на сколько повышается продуктивность штамма-продуцента L-пролина».

4. Андрейчук Ю.В., к.б.н., м.н.с. лаборатории мутагенеза и генетической токсикологии Санкт-Петербургского филиала Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук. Замечаний нет.

5. Петриков К.В., к.х.н., с.н.с. ФИЦ «Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Замечания:

а) автором не указан источник получения используемых штаммов. Если они получены в оригинальном исследовании рекомендуется как можно скорее депонировать их.

б) при описании статистической обработки в разделе «Материалы и методы» -t критерий

Стьюдента назван непараметрическим, что неверно.

в) для некоторого улучшения стиля изложения можно порекомендовать совсем от таких словосочетаний, как «процесс ацетилирования».

6. Шилова Н.В., к.х.н., с.н.с. отдела химической биологии гликанов и липидов Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
Замечания:

а) При модуляции описанного процесса всегда следует помнить и о его обратной стороне, когда излишнее ацетилирование белков приводит к потере их активности (особенно это касается ферментов), что и было продемонстрировано в данной работе, однако не нашло отражения в практических выводах (например, в виде рекомендации как достичь баланса между этими процессами с практической точки зрения).

б) Отсутствует пояснение для несведующих читателей, почему важно биотехнологически наращивать описанные (и, по-видимому, другие) аминокислоты.

в) В положениях, выносимых на защиту, а также в выводах не указано за счет чего происходит усиление ацетилирования/деацетилирования белков в штаммах-продуцентах. Это должно быть ясно без прочтения автореферата.

г) На стр. 17 во фразе «Исследователи использовали ....» не ясно, о чем идет речь – о диссертанте как исследователе или о литературных данных, поскольку ссылка не приведена. Подобные неудачные формулировки и англицизмы встречаются и в других местах автореферата (например, «продуктивность целевых аминокислот», «метаболизма *E.coli* штамма-продуцента» и др.).

7. Яббаров Н.Г. – к.б.н., с.н.с. лаборатории количественной онкологии 0103, ФНГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук. Замечание: в автореферате явным образом не раскрыт механизм, посредством которого ацетилирование влияет на продуктивность штаммов, что может снизить доступность информации для специалистов из других областей

8. Наумова Е.С., д.б.н., профессор, начальник лаборатории молекулярной генетики дрожжей, НИЦ Курчатовский институт. Замечаний нет.

9. Губайдуллин И.И., к.б.н., н.с., лаборатории систем экспрессии генов НИЦ «Курчатовский институт». Замечаний нет.

10. Богатырева Н.С., к.ф.-м.н., нс лаборатории физики белка Института белка РАН. Замечание: «...хотелось бы узнать подробнее о биохимических механизмах влияния ацетилирования на продуктивность производства аминокислот, а также сравнить влияние ацетилирования на разные штаммы-продуценты и с чем связаны различия...».

Все отзывы положительные.

**Вопросы задавали:** д.б.н. Равин Н.В., д.б.н. Николаев Ю.А., д.б.н. Летаров А.В., д.х.н. Варламов В.П., д.б.н. Пименов Н.В.

**В дискуссии приняли участие:** д.б.н. Летаров А.В., д.б.н. Пименов Н.В.

**Диссертационный совет отмечает, что** диссертация Плехановой Н.С., посвященная изучению ацетилирования белков и влиянию этих процессов на метаболизм штаммов-продуцентов, является завершенной научно-квалификационной работой.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем,** что впервые показана возможность реализовывать процессы ферментативного и неферментативного

ацетилирования *in vivo*. Показано влияние аминокислотных замен на реализацию процессов ацетилирования, а на основании результатов молекулярного моделирования и молекулярного докинга, соискателем предложено объяснение выявленным эффектам.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики** подтверждается тем, что потребность в аминокислотах увеличивается с каждым годом, а снижения доли их импортозамещения можно добиться благодаря созданию новых штаммов-продуцентов и усовершенствования тех, которые уже показали свою эффективность в производственных процессах. Возможность регуляции внутриклеточной активности ГАФД посредством модуляции степени его ацетилирования в зависимости от уровней экспрессии генов *patZ* и *cobB*, а также доступности ацетил-КоА, может представлять удобный инструмент метаболической инженерии для создания рекомбинантных продуцентов, использующих в качестве источника углерода гликолитические субстраты.

**Оценка достоверности результатов исследования** выявила, что полученные результаты являются воспроизводимыми и достоверными, а выводы – обоснованными. При выполнении диссертационной работы был применен комплекс микробиологических, молекулярно-биологических и генетических подходов. 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. Автореферат полностью отражает основные научные результаты диссертации.

**Личный вклад соискателя** состоит в самостоятельной постановке целей и задач исследования, разработке оригинальной методики, проведении комплексных экспериментальных исследований. Соискатель реализовал статистическую обработку данных, проведя сравнительный анализ и интерпретацию результатов, а также апробацию основных положений работы на различных конференциях, подготовку публикаций по теме работы.

#### **Заключение.**

Диссертация **Плехановой Натальи Сергеевны «Влияние процессов N<sub>ε</sub>-ацетилирования белков на регуляцию метаболических потоков в *Escherichia coli* штаммах-продуцентах аминокислот»** является законченной научно-квалификационной работой, внесшей вклад в изучение биотехнологических аспектов получения аминокислот.

Диссертационная работа Плехановой Н.С. соответствует п. 2. «Генетические, селекционные и иммунологические исследования в прикладной микробиологии, вирусологии и цитологии. Технологии культивирования микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных», п. 3 «Микробная и клеточная биотехнология», п. 8 «Промышленная биотехнология, включая создание и применение промышленных микробных продуцентов. Микробиологическое производство кормового белка» паспорта специальности 1.5.6. «Биотехнология», отрасль науки – Биологические науки.

Работа соответствует профилю Диссертационного совета 24.1.233.02 и требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук в соответствии с п. 9-11, 13-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (с изменениями и дополнениями в редакции № 62 от 25.01.2024).

На заседании 25 декабря 2024 г. Диссертационный совет 24.1.233.02 принял решение присудить Плехановой Наталье Сергеевне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология».

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 чел., из них 8 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали «за» присуждение ученой степени – 16, «против» – 0, недействительных бюллетеней – 0.

Председатель диссертационного  
совета 24.1.233.02  
ФИЦ Биотехнологии РАН,  
доктор биологических наук

Н.В. Пименов

Ученый секретарь диссертационного  
совета 24.1.233.02  
ФИЦ Биотехнологии РАН,  
доктор биологических наук

Т.В. Хижняк

25 декабря 2024 г.

