

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Хозова Андрея Александровича: «Исследование механизма транспорта L-треонина и L-серина через цитоплазматическую мембрану *Escherichia coli* K-12», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям

1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология

Диссертационная работа Андрея Александровича Хозова посвящена поиску, идентификации и описанию новых транспортных систем, контролирующих поглощение L-треонина и L-серина в клетку *Escherichia coli*.

L-треонин – одна из важнейших аминокислот, наиболее востребованных в пищевой, косметической и медицинской промышленности, а также в сельском хозяйстве. Современная биотехнологическая ферментация обеспечивает экономически и экологически эффективное промышленное производство L-треонина, в мировых масштабах достигающее 700000 тонн в год. *E. coli* остается микробиологической «рабочей лошадкой» производства аминокислот, в силу хорошей изученности и применимости различных современных методов генетической и метаболической инженерии для совершенствования штаммов-продуцентов.

Наряду с оптимизацией ферментов цикла синтеза L-треонина, снижением уровня биосинтеза побочных продуктов, повышением эффективности экспорта продукта, одним из способов улучшения штаммов-продуцентов является снижение «feedback inhibition» (ретроингибирования) - подавления синтеза L-треонина за счет поступающего из культуральной жидкости самого L-треонина и L-серина. Модификация транспортных потоков клетки для снижения импорта нежелательных соединений дает заметный выигрыш в эффективности продуцентов.

Однако, несмотря на многолетние исследования *E. coli*, отдельные аспекты её молекулярной физиологии, в частности факторы импорта аминокислот, включая L-треонин и L-серин, остаются недостаточно изученными. В связи с этим восполнение существующих пробелов в знаниях

о системах транспорта гидроксиаминокислот придаёт работе А.А. Хозова и фундаментальную, и прикладную значимость. Данные, полученные в ходе диссертационного исследования, могут быть использованы при конструировании более эффективных штаммов-продуцентов.

Диссертационная работа Андрея Александровича Хозова построена по классическому плану, изложена на 166 страницах текста и содержит 27 рисунков, 6 таблиц и 4 приложения. Рукопись состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения и выводов, списка литературы, включающего 290 источников, и приложений. Структура работы логична, текст изложен грамотно и последовательно. Содержание каждой части соответствует поставленным задачам, хорошо иллюстрировано рисунками и таблицами.

Обзор литературы состоит из четырех глав. В нем рассмотрены основные механизмы транспорта веществ через мембраны бактерий. Подробно охарактеризованы пассивный и активный транспорт. Особое внимание уделено первичным активным транспортёрам и вторичным переносчикам. В работе подробно освещаются классические данные о транспорте гидроксиаминокислот в клетку *E. coli*. Особое место в обзоре занимает обсуждение механизмов управления экспрессией генов, контролирующих синтез транспортных белков, в частности, новых данных о роли малых некодирующих РНК в регуляции экспрессии. В заключительной главе приведено описание биотехнологических исследований, в которых путём модификации транспортных систем удавалось улучшить характеристики штаммов — продуцентов востребованных химических соединений. Обзор отличается хорошей структурированностью и высокой информативностью. Автор опирается на исторические и современные научные источники, каждый высказанный тезис подкреплён ссылками на конкретные публикации.

В разделе **Материалы и методы** подробно описаны объекты исследования, используемые реактивы, материалы и экспериментальные

методики. Используемые автором методы исследования достаточно современны и адекватны поставленным задачам. Перечень сконструированных в ходе работы плазмид и штаммов указывает на значительный объём проведённых экспериментов. Описание микробиологических, биохимических и молекулярно-генетических методик свидетельствует о высокой методической подготовке диссертанта и достаточно для независимого воспроизведения экспериментов. Автором проведён адекватный статистический анализ данных с использованием соответствующих критериев, что подтверждает достоверность полученных результатов.

Раздел **Результаты и их обсуждения** посвящен поиску и описанию новых транспортных систем треонина и серина, а также применению полученных знаний для оптимизации свойств штамма-продуцента треонина. Изложение экспериментальной работы сопровождается таблицами и рисунками, иллюстрирующими дизайн экспериментов и отражающими их результаты.

В разделах **Заключение** и **Выводы** последовательно сформулированы основные результаты исследования. Изложение очень детально, полно отвечает на вопросы поставленных в работе целей и задач. Представленные в диссертации материалы логично обобщаются.

Научная новизна заключается в идентификации и характеристике ранее неизученного гена *uifK*, который контролирует поглощение L-треонина и L-серина. Автором установлены кинетические параметры функционирования этого переносчика, а также экспериментально показаны особенности регуляции его экспрессии и активности. Впервые показана способность транспортных систем BrnQ и LIV-I к поглощению L-треонина, а также выявлена активность LIV-I в отношении L-серина. Дополнительно были обнаружены ранее неохарактеризованные у-гены, которые способны компенсировать дефект транспорта треонина при их амплификации или

мутации. Эти результаты заслуживают отдельного внимания, поскольку позволяют в дальнейшем определить их истинные субстраты.

Научная и практическая значимость проведённого исследования определяется его вкладом в развитие современных представлений о механизмах транспорта аминокислот в клетках бактерий. Идентификация ранее неохарактеризованных генов и изучение их роли в транспорте треонина и серина расширяют возможности целенаправленного исследования бактериальной физиологии и потенциально служат базой для разработки новых подходов к борьбе с бактериальными инфекциями. Практическая значимость работы проявляется в её применимости для биотехнологии: полученные данные могут быть использованы при создании эффективных штаммов-продуцентов аминокислот, в частности L-треонина.

В целом работа Андрея Александровича Хозова представляет собой законченное научное исследование, актуальность и новизна которого не вызывает сомнений. Принципиальных замечаний к диссертационной работе у оппонента не имеется. В ходе работы автор часто описывает и иллюстрирует эксперименты, из которых следует, что высокая концентрация треонина может ингибировать рост клеток. Однако, причина наблюдаемого фенотипа нигде не описана, в том числе в разделе «Обзор литературы». Учитывая, что треонин не является токсичным соединением, возникает вопрос: каков механизм негативного влияния треонина на рост клеток *E. coli*? Кроме того, в ходе работы используются данные полногеномного секвенирования, но описания методики получения этих данных не представлено. Также некоторое удивление вызывает очень мелкий масштаб иллюстраций, зачастую подпись к рисунку занимает больше места, чем сама фотография клеточных культур. Этот недостаток оформления, впрочем, не умаляет значимости диссертационного исследования и не влияет на общую положительную оценку диссертационной работы.

Работа Хозова А.А. «Исследование механизма транспорта L-треонина и L-серина через цитоплазматическую мембрану *Escherichia coli* K-12» отвечает

требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология (биологические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Хозов Андрей Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

доктор химических наук, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биоинженерии отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений, ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Мирошников Константин Анатольевич

дата: 16.05.2025 г.

Контактные данные: +7 (495) 335-55-88, e-mail: kmi@bk.ru

Специальности, по которым официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.04 - Биохимия, 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) (хим. науки)

Адрес места работы: 117997, г. Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

Подпись К.А. Мирошникова заверяю:

Зам. Директора ГНЦ ИБХ РАН по научной работе,
доктор химических наук, профессор РАН

Алексей Анатольевич Белогурцев