

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

Актуальность

Аминокислоты являются важными компонентами кормов сельскохозяйственных животных, а полноценность кормового белка во многом определяется содержанием и соотношением в нем аминокислот, главным образом, незаменимых, включая треонин. Треонин необходим для правильного функционирования иммунной и пищеварительной систем.

В настоящее время потребности сельского хозяйства в треонине покрываются, в основном, за счет импортных поставок, и остро стоит задача импортозамещения в этой области. Для решения этой задачи необходима разработка биотехнологий производства треонина, основанных на применении высокоэффективных микробных продуцентов.

Транспорт аминокислот играет важную роль в функционировании микробных продуцентов, и в этой связи диссертационная работа Хозова А.А. посвященная поиску, обнаружению и описанию транспортных систем, вовлечённых в транспорт L-треонина и L-серина в клетку *Escherichia coli*, несомненно, является актуальной. Бактерии *E. coli* являются наиболее изученным и охарактеризованным модельным объектом в микробиологии, однако, имеются пробелы в понимании ряда аспектов транспорта аминокислот у этих бактерий, часть из которых удалось восполнить в данной работе.

Научная новизна и значимость исследования

В работе впервые идентифицирован и подробно охарактеризован новый переносчик YifK, который участвует в поглощении треонина и серина

клетками бактерий *E. coli*. Показана активность по отношению к L-треонину у переносчиков аминокислот с разветвленным радикалом BrnQ и LIV-I, для которых эта функция ранее не была известна. Устранение специфичной активности в отношении треонина позволило идентифицировать множество угенов, которые принимают участие в поглощении треонина при нефизиологичных условиях. Продемонстрировано положительное влияние инактивации найденных генов на уровень продукции треонина культурой штамма-продуцента. Результаты важны для понимания особенностей транспорта треонина и серина через цитоплазматическую мембрану у бактерий *E. coli* и могут быть использованы при создании новых высокоэффективных штаммов – продуцентов треонина.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Достоверность полученных результатов диссертационного исследования подтверждена их верификацией с использованием широкого арсенала современных методов молекулярной биологии, микробиологии, биохимии, биоинформатики, характеризующихся высокой специфичностью и воспроизводимостью и выполненных на современном высокотехнологичном оборудовании. Результаты работы опубликованы в рейтинговых рецензируемых международных изданиях, индексируемых в международных и российских базах Scopus, Web of Science, ВАК (3 статьи), в 3 Патентах РФ, обсуждены на международных и российских научных конференциях. В целом, достоверность результатов исследования, степень обоснованности положений, заключения и выводов, сформулированных в диссертации, не вызывают сомнений. Выводы исследования отвечают целям и задачам и базируются на большом объеме экспериментальных данных, полученных с использованием современных методов.

Содержание диссертации, ее завершенность

Диссертация Хозова А.А. изложена на 166 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, списка цитируемой литературы, включающего 290 источников, и Приложения. Работа проиллюстрирована 27 рисунками и содержит 6 таблиц.

Во введении автор раскрывает актуальность диссертационного исследования, формулирует его цели, задачи и методологические подходы, описывает научную новизну и значимость полученных результатов, указывает сведения об апробации результатов и свой личный вклад.

В **обзоре литературы (35 стр.)** большое внимание уделено описанию общих сведений о механизмах трансмембранного транспорта растворенных веществ, подробно представлены существующие данные о переносчиках гидроксиаминокислот, рассмотрены механизмы регуляции синтеза мембранных переносчиков, а также показано практическое применение полученных знаний о механизмах транспорта ценных химических веществ в контексте задач промышленной биотехнологии.

Обзор дает ясное представление о современном состоянии исследований в данной области, представляет собой глубокое аналитическое исследование, и, на мой взгляд, можно его рекомендовать к публикации.

В разделе **«Материалы и методы» (21 стр.)** подробно описаны методы, использованные в работе. Использован широкий арсенал современных молекулярно-биологических, биохимических и микробиологических методов исследований, сочетание которых позволяет получать достоверные результаты. Методы адекватны поставленной цели и задачам исследования. К этому разделу также можно отнести раздел **«Приложения» (6 стр.)**, включающий таблицы олигонуклеотидов, использованных в работе, и штаммов, с описанием их конструирования. Эти разделы однозначно демонстрируют большую проделанную работу по конструированию штаммов и плазмид.

В разделе «**Результаты и их обсуждение**» (50 стр.) грамотно и последовательно изложены результаты проделанной работы. Эта часть представлена в четырех основных главах, в которых с использованием графического материала и таблиц изложены результаты, раскрывающие суть диссертационного исследования.

В процессе трактовки результатов диссертант опирается на представленные в литературе данные, а также высказывает собственные идеи о роли выявленных новых переносчиков аминокислот в транспорте треонина и серина в клетках *E.coli* и связи инактивации ряда генов с уровнем продукции треонина.

Автором представлено «**Заключение**», в котором обстоятельно систематизированы результаты диссертационной работы. **Выводы** сформулированы четко и обосновано, и полностью отражают представленный экспериментальный материал.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Достоинства и недостатки диссертации

В целом, диссертация А.А. Хозова является оригинальным и высококачественным исследованием, имеющим высокую научную и практическую ценность. Рецензируемая работа выполнена на высоком теоретическом и практическом уровне, имеет логику и является законченным исследованием.

Несомненными достоинствами работы являются применение большого арсенала современных методов, высокий уровень экспериментальных исследований, позволивший восполнить пробелы в понимании транспорта треонина и серина у бактерий, выявить новые переносчики аминокислот и заложить основы для повышения эффективности штаммов – продуцентов треонина. Работа прекрасно оформлена. Современное состояние исследований, методы и результаты исследований изложены четко и ясно, раздел “Заключение” позволяет оценить место данного исследования в области изучения транспорта аминокислот у бактерий. Все поставленные

задачи исследования выполнены. Положения, выносимые на защиту, подтверждены полученными экспериментальными результатами.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет. Имеются следующие вопросы и замечания:

1. Описание механизмов действия различных транспортных систем, белков – переносчиков в “Обзоре литературы” желательно было бы сопроводить иллюстрациями.

2. В конце “Обзора литературы” было бы желательно привести небольшое заключение, обобщающее современное состояние исследований в изучаемой области и обосновывающее цели и задачи работы.

3. В разделе 2.1 “Среды и реагенты” сведения о реагентах и источниках их получения не приведены.

4. При описании ряда методов и при обсуждении ряда экспериментальных данных упущены некоторые ссылки на известные методы, использованные в работе (например, касающиеся очистки олигонуклеотидов (стр. 50) или сравнения с результатами, полученными ранее (например, стр.93, при упоминании результатов, полученных ранее для *S. enterica*).

5. При описании состава сред содержание компонентов следует выражать единообразно, либо в г/л, либо в мМ, либо в %. При описании ряда методов это нарушено (например, на стр. 56, 60 и др.).

6. Автор ошибочно указывает (стр.56), что «ДНК экстрагировали последовательно равным объемом смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт...». Следует отметить, что при данном методе не происходит перехода ДНК в раствор фенол-хлороформа-спирта, то есть экстракции ДНК не происходит, а происходит очистка ДНК за счет экстракции белков и липидов.

7. Не указан источник фага P1vir (Стр 60).

8. В результатах (стр.75) имеется указание на результаты секвенирования полного генома штамма B1082, однако в Методах отсутствует информация о полногеномном секвенировании данного штамма (как проводилось, на каком оборудовании, сборка генома и др.)

- Допущены ряд неудачных выражений и имеются замечания оформительского характера. Например, на стр.108 автор пишет: «оперона *parVA*, кодирующего пили, ассоциированные с пиелонефритом». Очевидно, имелось ввиду, что данный оперон кодирует белки, из которых состоят пили? Автор использует термин “токсичные концентрации треонина”, однако, не во всех случаях правомерно, поскольку, как показано в данной работе, разные штаммы были чувствительны к разным концентрациям треонина, и не совсем понятно, какие концентрации треонина имеются ввиду.

Отмеченные недостатки носят рекомендательный характер и не снижают новизны и значимости диссертационной работы Хозова А.А. «Исследование механизма транспорта L-треонина и L-серина через цитоплазматическую мембрану *Escherichia coli* K-12». Диссертация 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 (биологические науки).

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,

заведующая лабораторией микробиологической трансформации органических соединений,

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина Российской академии наук (ИБФМ РАН).

Донова Марина Викторовна

дата: 14.05.2025

Контактные данные:

тел.: +7 (4967) 73-39-62

e-mail: mv_donova

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
03.00.07-Микробиология

Адрес места работы: 142290, Россия, г. Пушкино Московской области, проспект Науки, д. 5. Тел: +7 (4967) 73-39-62, e-mail: adm@ibpm.ru

Подпись Доновой М.В. заверяю