

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Казиевой Екатерины Дмитриевны, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук, на тему: «Новые устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы, улучшающие продукцию изопрена клетками *Pantoea ananatis*», по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

В автореферате диссертации Екатерины Дмитриевны, в общей характеристике работы, раскрыта проблематика, обусловившая проведение данного исследования - подчеркнута значимость изопрена, как метаболического предшественника множества важных соединений, и указана ключевая роль мевалонаткиназ в синтезе изопрена в клетке. Актуальность изучения регуляции мевалонаткиназ обоснована в связи с исследованием генетических заболеваний человека и созданием антимикробных и антипаразитарных лекарств. Указана недостаточная изученность регуляции мевалонаткиназ (в том числе ретроингибирования активности фермента продуктами реакции), чем и обоснована научная новизна поиска новых мевалонаткиназ и изучения их свойств. **В качестве замечания** к общей характеристике работы можно отметить, что актуальность разработки процессов микробного синтеза изопреноидов (в т.ч. изопрена) раскрыта неполно. Не указаны преимущества (или потенциальные преимущества) микробного синтеза перед химическими способами синтеза изопрена, и слишком общо дано понимание того, для чего на сегодняшний день может быть использован на практике изопрен.

Цели и задачи работы сформулированы чётко, изложение результатов в автореферате подробно иллюстрирует выполнение всех задач и достижение цели, положения, выносимые на защиту, хорошо раскрывают полученные данные. Научную ценность составляет существенное расширение круга мевалонаткиназ, устойчивых к ретроингибированию. Впервые обнаруженные необычные для мевалонаткиназ свойства для фермента из *M. concilii* – тетрамерная структура и активация одним из интермедиатов пути биосинтеза изопреноидов. Было продемонстрировано преимущество новых мевалонаткиназ устойчивых к ретроингибированию с лучшими кинетическими параметрами для продукции изопрена, что и являлось основной целью исследования.

Достоинствами работы являются, кроме того, высокий методический уровень проведения всех экспериментов, и огромный объём полученных результатов. Фактически, выполнение четвёртой задачи (дальнейшее улучшение продукции штаммами изопрена) даже превышает заявленную в названии цель научного исследования. **В качестве замечания** можно отметить неясности изложения результатов в некоторых местах раздела «Основное содержание работы».

На стр. 7-8 указано, что гены мевалонаткиназ были клонированы в двух вариантах – с His-Tag меткой на С или N конце гена, и что более высокое накопление целевого белка наблюдалось во втором случае. Однако неясно, какой именно случай иллюстрирует рисунок 3, и какие варианты в итоге были использованы для метал-аффинной очистки белков. Далее, указано, что «*Растворимость рекомбинантных полипептидов могла быть существенно повышена при культивировании клеток при пониженной температуре (20°C).*», но не указано, были ли использованы такие условия культивирования для улучшения растворимости.

На странице 11 указано, что генетическое окружение мевалонаткиназ в разных организмах было проанализировано с помощью программного обеспечения STRING v.10, и не приведено обоснование эффективности использования именно этого инструмента для выполнения этой задачи. Результаты анализа, приведённые на рисунке 10, являются, как можно понять из рисунка, просто фрагментами геномов, содержащих интересующие автора мевалонаткиназы, и не иллюстрируют результатов использования STRING,

являющегося, по информации разработчиков, пакетом для анализа белок-белковых взаимодействий.

На странице 16 указано, что *«продукция изопрена ... составила 563 мг. Последующая замена ... промотора ... привела к ... увеличению продукции до 869 мг.»*. Не приведены показатели выхода по глюкозе, достигнутые в этих случаях (как это сделано в таблице 3).

На странице 16 указано, что для конструирований были использованы *смеси CRIM плазмид*, без пояснения этого сокращения.

Указанные замечания не снижают ценности работы Екатерины Дмитриевны, и обоснованности и достоверности представленных экспериментальных результатов. По теме диссертационной работы был получен один патент и опубликовано две статьи в рецензируемых научных изданиях, одна статья в зарубежном журнале, в которой Екатерина Дмитриевна – первый автор.

Подводя итог можно утверждать, что диссертационная работа Е. Д. Казиевой полностью удовлетворяет требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Старший научный сотрудник
Лаборатории молекулярной биотехнологии НИЦ «Курчатовский институт» -
ГосНИИгенетика
к.б.н.

(подпись)

Лавров Константин Валерьевич

Подпись удостоверяю
Иванов И.И.

(печать)