

ОТЗЫВ

официального оппонента
на диссертацию Казиевой Екатерины Дмитриевны, представленную 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»

Актуальность темы диссертационной работы

В последние годы большое внимание уделяется проблеме поиска новых потенциальных продуцентов биологически активных веществ, в целом, и бактерий, в частности. В этом плане меняется акцент от поиска природных бактериальных продуцентов к разработке подходов метаболической инженерии для обеспечения высокоэффективного синтеза интересующего продукта – вторичного метаболита – за счет реконструирования генома продуцентов. Для решения этой проблемы актуальными являются вопросы теоретической реконструкции интересующего метаболического пути с последующей экспериментальной верификацией такого реконструирования, и разработки на основе этих знаний контролируемой регуляции синтеза важных целевых вторичных метаболитов в клетке. Такие исследования важны как с фундаментальной точки зрения, так и с практической. Диссертационная работа Казиевой Екатерины Дмитриевны посвящена поиску не подверженных ретроингибированию мевалонаткиназ, определение их кинетических параметров *in vitro* и конструирование на их основе штаммов-продуцентов *Pantoea ananatis* с увеличенным накоплением изопрена. Принимая во внимание вышеизложенное, актуальность этой работы не вызывает сомнения.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа, в целом, написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения.

После краткого введения, в котором определены цель и задачи исследования, проведен анализ литературных источников, которые имеют непосредственное отношение к изучаемой проблеме. Обзор литературы охватывает широкий круг вопросов, а именно приводится: (1) описание путей биосинтеза предшественников изопреноидов – мевалонатного (MVA) и метилэритритолфосфатного (MEP); (2) детальная характеристика ключевых ферментов мевалонатного пути; (3) описание метилэритритолфосфатного пути как основного пути биосинтеза изопреноидов у бактерий; (4) современные данные о конструировании и использовании

гетерологичного мевалонатного пути для продукции изопреноидов в *E. coli*; и в заключительном разделе дается характеристика *Pantoea ananatis* как бактериального продуцента с высоким биотехнологическим потенциалом.

В целом обзор литературы написан хорошим языком и касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы. Следует отметить, что все литературные данные анализируются соискателем квалифицированно и подробно, поэтому цель и задачи, поставленные автором работы, звучат вполне убедительно.

Традиционно после обзора литературы приводится описание материалов и методов исследования. В этой главе соискателем детально изложены методические особенности и приемы работы. Использован целый арсенал классических и современных методов, применяемых в мировой практике генетических и молекулярных исследований, анализа экспрессии генов. Следует отметить вполне удовлетворительную разрешающую способность избранных для работы методов и в ряде случаев их успешную модификацию с учетом специфики проводимых исследований.

Аналитическое рассмотрение Главы "Результаты и обсуждение" позволяет заключить следующее: соискателем была предпринята серия экспериментов, спланированных на хорошем профессиональном уровне, которые позволили полностью решить поставленные в ходе работы задачи. Эта часть диссертационной работы включает два основных раздела, которые представлены подразделами.

Прежде всего, хотелось подчеркнуть, что проведенные Екатериной Дмитриевной исследования базируются на литературных данных, а также результатах, полученных в организации ранее, и сформулированных на основании этого целей и задачах исследования.

Первая часть работы посвящена выбору генов, предположительно кодирующих устойчивые к ретро-ингибированию мевалонаткиназы, их клонированию и сравнительному анализу их кинетических параметров, в том числе включая и проверку их ретро-ингибирования. Основываясь на литературных данных о том, что в архее *Methanosarcina mazei* из класса *Methanomicrobia* найдена устойчивая к ретро-ингибированию мевалонаткиназа (MVK), и результатах проведенного филогенетического анализа белковых последовательностей мевалонаткиназ представителей архей из класса *Methanomicrobia*, соискатель делает вполне обоснованный выбор двух MVK из *M. paludicola* и *M. concilii* для дальнейшего исследования. Результаты сравнительного анализа кинетических параметров пяти клонированных MVK из *M. concilii*, *M. paludicola*, *M. mazei*, *S. cerevisiae* и *N. maritimus*

позволили соискателю сделать следующее обоснованное заключение — мевалонаткиназы из *M. concilii* и *M. paludicola* могут быть использованы для синтеза изопрена в промышленных масштабах. Это заключение базируется на следующих экспериментальных данных: (1) мевалонаткиназы из *M. concilii* и *M. paludicola* имеют примерно в пять раз большее сродство к мевалонату и АТР, по сравнению с ранее описанным ферментом из *M. mazei*; (2) мевалонаткиназа из *M. paludicola* имеет в два раза большую, а мевалонаткиназа из *M. concilii* почти в четыре раза большую каталитическую эффективность; (3) мевалонаткиназы из *M. concilii* и *M. paludicola* устойчивы к ретро-ингибированию.

Поскольку диссертант выяснила, что мевалонаткиназы из *M. concilii* и *M. paludicola* устойчивы к ретро-ингибированию, и дополнительно продемонстрировала, что активность мевалонаткиназы из *M. concilii* возрастает на 20% под действием одного из ретро-ингибиторов DMAPP, это послужило отправной точкой для выяснения логично высказанного предположения, что экспрессия части генов MVA пути у этих архей координируется на уровне транскрипции, т.е. данные археи могут использовать другой механизм регуляции MVA пути. И действительно, *in silico* анализ генетического окружения генов мевалонаткиназ *M. concilii* и *M. paludicola* показал, что устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы присутствуют в геноме в составе оперона генов мевалонатного пути, но не индивидуального гена. Этот факт предполагает наличие различных механизмов регуляции мевалонатного пути в зависимости от взаимного расположения его генов. Более того, за счет выравнивания аминокислотных последовательностей мевалонаткиназ, имеющих разный профиль ингибирования, выявлены особенности структур, отвечающих за спектр ингибиторов, и выдвинуто предположение о том, какая область последовательности определяет уникальные свойства мевалонаткиназы из *M. concilii*.

Таким образом, клонированы, охарактеризованы и выбраны две мевалонаткиназы, имеющие привлекательные свойства для их применения в метаболической инженерии пути биосинтеза изопрена.

Вполне логичными видятся дальнейшие исследования Екатерины Дмитриевны, результаты которых представлены во второй части раздела по конструированию штаммов-продуцентов *Pantoea ananatis* с увеличенным накоплением изопрена за счет экспрессии обоснованно выбранных генов мевалонаткиназ. Результаты проведенного сравнительного исследования показали, что (1) в штамме *Pantoea ananatis*, несущем дополнительный ген мевалонаткиназы из *S. cerevisiae*, экспрессия генов *mvk* из *M. paludicola* или *M. concilii*, обеспечила большую продукцию изопрена, чем интеграция ранее известного гена из *M. mazei*; (2) удаление гена мевалонаткиназы из *S. cerevisiae*

4

у линии штаммов с мевалонаткиназой из *M. paludicola*, с последующим клонированием и интеграцией в хромосому этого штамма-продуцента фрагмента, включающего гены PMK, MVD и yldI с оптимизированной для экспрессии последовательностью ДНК привело к двойному увеличению выхода изопрена; (3) замена арабинозного промотора перед генами верхнего MVA пути на авторегулируемый промотор P_{phos} , активирующийся лимитом по фосфату, позволило дополнительно увеличить выход изопрена, практически в 4 раза, по сравнению с исходным штаммом *Pantoea ananatis*.

Несмотря на то, что основная цель диссертационной работы - поиск не подверженных ретро-ингибированию мевалонаткиназ, определение их кинетических параметров *in vitro* и конструирование на их основе штаммов-продуцентов *Pantoea ananatis* с увеличенным накоплением изопрена - практически достигнута, соискатель ставит перед собой еще одну важную задачу. Эта задача - увеличить продукцию изопрена штаммом-продуцентом за счет сбалансированного усиления экспрессии генов мевалонатного пути. Необходимость решения такой задачи обусловлена рядом причин: (1) накопление фосфорилированных интермедиатов, которые являются продуктами реакции мевалонаткиназы и последующих ферментов мевалонатного пути, может приводить к ингибированию важных клеточных процессов; (2) IPP, DMAPP и пиродифосфаты с более длинной цепью необходимы клетки, и истощение их пула приводит к остановке роста культуры клеток; (3) для синтеза изопреноидов необходимо строго определенное соотношение концентраций IPP и DMAPP, которое определяется свойствами IPP изомеразы и нарушается при биосинтезе изопрена.

Для решения этой задачи, Екатериной Дмитриевной проведена обширная серия экспериментов, которая проведена в логической последовательности, и включает: (1) конструирование базового штамма для одновременной интеграции нескольких экспрессионных кассет; (2) модификацию метода Dual In/Out для конструирования штамма; (3) сравнительный анализ зависимости уровня экспрессии гена от его локализации в геноме *P. ananatis*; (4) определение лимитирующей активности MVA пути в модельном штамме и (5) получение набора штаммов, содержащих дополнительные копии генов MVA пути, за один раунд интеграции с последующим отбором клонов с оптимальным сочетанием числа копий генов MVA пути с увеличенной продукцией изопрена. Совокупность полученных соискателем результатов экспериментальных исследований позволили в итоге разработать новый метод сбалансированного усиления экспрессии генов целевого биосинтетического пути за счёт их одновременной интеграции в виде смеси интегративных плазмид в подготовленные локусы бактериальной хромосомы с последующей селекцией лучших

5

вариантов по продукции целевого соединения, а именно, изопрена, достигнув увеличение его продукции штаммом-продуцентом на 30%.

Степень новизны результатов научных исследований.

Соискателем клонированы новые гены, кодирующие устойчивые к ретро-ингибированию мевалонаткиназы из архей *M. concilii* и *M. paludicola*, и получено экспериментальное подтверждение того, что их кинетические свойства, устойчивость к ретро-ингибированию дают им очевидные преимущества для использования увеличенной продукции изопрена в штамме-продуценте *P. ananatis*.

Проведенные исследования впервые продемонстрировали, что активной формой мевалонаткиназы из *M. concilii* является тетрамер, в отличие от характерной для данного семейства GNMP киназ димерной формы.

Приоритетными можно назвать и результаты по разработке и экспериментальной верификации метода сбалансированного усиления экспрессии генов целевого биосинтетического пути за счёт их одновременной интеграции в виде смеси интегративных плазмид в подготовленные локусы бактериальной хромосомы с последующей селекцией лучших вариантов по продукции целевого соединения.

Научная и практическая значимость результатов

Диссертационная работа Екатерины Дмитриевны Казиевой совмещает в себе и фундаментальность, и практическую значимость. Полученные соискателем результаты важны для развития фундаментальных представлений о молекулярных механизмах регуляции метаболических путей биосинтеза изопрена. С практической точки зрения, данная работа интересна тем, что разработанная стратегия сбалансированного усиления экспрессии генов целевого биосинтетического пути за счёт их одновременной интеграции в виде смеси интегративных плазмид в подготовленные локусы бактериальной хромосомы может быть применена для конструирования штаммов-продуцентов других хозяйственно-важных биологически активных соединений.

Обоснованность и вероятность заключительных выводов и рекомендации

Использование для исследований классических и современных молекулярно-биологических и генетических методов, а также методов анализа экспериментального материала подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных

результатов, представленных в диссертационной работе Екатерины Дмитриевны, а также выносимых на защиту положений и выводов.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты исследований по диссертации Екатерины Дмитриевны Казиевой опубликованы в 3 работах (в том числе в 2 статьях в журналах, рекомендованных ВАК). Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

При аналитическом рассмотрении представленных в диссертационной работе материалов возник ряд вопросов:

1. Что послужило основанием выбора мевалонаткиназы из *N. maritimus* для сравнительных исследований кинетических свойств и ретро-ингибирования мевалонаткиназ из исследуемых архей? Предварительные экспериментальные данные, данные научных публикаций?
2. Как рассчитана продукция изопрена штаммами, содержащими различные гены мевалонаткиназ (Таблица 9 в диссертации, колонка «Изопрен, мг» и колонка «Выход г/г%»)? На что рассчитаны значения «Выход г/г%» - на глюкозу или на другой параметр? Вопрос в отношении «Изопрен, мг» - это суммарное накопление изопрена во время культивирования штаммов в течение 65 часов при 32°C?
3. Как рассчитаны значения «Изопрен, мг/л» на рисунке 24 и в таблице 10 (Накопление изопрена штаммами с дополнительной копией одной из кассет)? И как сопоставить количественные данные по продукции изопрена, приведенные в таблице 9 и 10, которые выражены разными величинами?
4. Проводил ли соискатель статистический анализ всех количественных данных? С какой биологической и аналитической повторностью выполнены эксперименты?

Это осталось в работе без пояснения или обсуждения.

По разделам диссертационной работы Екатерины Дмитриевны Казиевой имеется ряд замечаний и пожеланий, которые могут быть учтены в дальнейших работах соискателя:

Ко всем разделам диссертационной работы:

- в отношении описания происхождения генов и белков - птичий, человеческий, крысиный и т. д. – авторское использование, например, - «птичий фермент»;
- на наш взгляд, работа только бы выиграла, если в конце главы «Обзор литературы» Екатерина Дмитриевна привела бы краткое заключение, в котором бы изложила какие вопросы остаются открытыми и какие исследования требуется провести;
- насколько справедливо использовать термины «высокая гомология», «низкая общая гомология (<20%)», «близкого по гомологии», «имеет большую гомологию»?
- в отношении использования такой терминологии как «сильно ингибируется», «значительно увеличилась» и т. д.;
- в тексте имеются некоторые стилистические погрешности неточности и неудачные выражения, и не профессиональное использование некоторых терминов и обозначений. Например, более профессионально было бы использовать обозначения: «N-концевая область белка» вместо «N-конец белка»; «Высокоочищенный активный фермент выделен из тканей птицы» вместо «Высокоочищенный активный фермент был приготовлен из тканей птицы», и т. д.
- Краткость, безусловно, сестра таланта (А.П. Чехов), однако только три заключительных вывода по столь обширным полученным результатам, на мой взгляд, не вполне оправдано.

Все замечания к работе исчерпываются вышеназванными, большинство из которых, видимо, следует отнести к разряду досадных неточностей в оформлении работы. Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной работы, выполненной, в целом, на высоком научном и методическом уровне, и оставляющей, в целом, хорошее впечатление. Следует еще раз отметить правильность выбранной стратегии исследования и высокую квалификацию исполнения, что положительно характеризует самого исследователя, а также, безусловно, свидетельствует о высоком уровне исследований научного подразделения, в котором выполнялась данная работа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация на тему «Новые устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы, улучшающие продукцию изопрена клетками *Pantoea ananatis*» по

актуальности, новизне, теоретической и практической значимости соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 в редакции Постановления Правительства № 335 от 21.04.2016, и представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, а ее автор, Казиева Екатерина Дмитриевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,

Руководитель группы функциональной геномики

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Институт физиологии растений им К.А. Тимирязева

Российской академии наук,

Голденкова-Павлова Ирина Васильевна

ые:

56; E-mail: irengold58@gmail.com; Специальность, по которой
 ном защищена диссертация: 03.02.07 – генетика

Адрес места работы:

127276 Российская Федерация, г. Москва, ул. Ботаническая, дом 35, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, группа функциональной геномики

Подпись сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук Ирины Васильевны Голденковой-Павловой удостоверяю:

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института физиологии растений им К.А. Тимирязева

Российской академии наук,

____ Наталья Витальевна Щербакова

Сведения об официальном оппоненте
по диссертационной работе Казиевой Екатерины Дмитриевны на тему «Новые устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы, улучшающие продукцию изопрена клетками *Pantoea ananatis*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Основное место работы, должность	Ученая степень, звание	Шифр специальности
Голденкова-Павлова Ирина Васильевна	Российская Федерация	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы функциональной геномики.	доктор биологических наук, доцент	03.02.07 – генетика

Основные научные труды по теме диссертации:

1. Irina V. Goldenkova-Pavlova, Olga S. Pavlenko, Orkhan N. Mustafaev, Igor V. Deyineko, Ksenya V. Kabardaeva and Alexander A. Tyurin. Computational and Experimental Tools to Monitor the Changes in Translation Efficiency of Plant mRNAs on a Genome-wide Scale: Advantages, Limitations, and Solutions. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(1), 33;
2. Irina V. Goldenkova-Pavlova, Alexander A. Tyurin, Orkhan N. Mustafaev. The features that distinguish lichenases from other polysaccharide hydrolyzing enzymes and the relevance of lichenases for biotechnological applications. *Appl Microbiol and Biotech.* (2018) 102 (9), 3951-3965 DOI: 10.1007/s00253-018-8904-x
3. Е.А. Звонова, О.А. Ершова, А.В. Ершов, А.А. Казаров, Е.С. Белянина, М.В. Лыков, А.Ю. Вишневский, А.П. Карпов, С.В. Ручко, А.М. Шустер, А.А. Соловьев, И.В. Голденкова-Павлова. Технология PASYLATION® позволяет улучшить фармакокинетические свойства рекомбинантного интерферона β -1b человека in vivo. *Биотехнология*. 2018. Т. 34. №2. р. 37-46
4. A. A. Tyurin, K. V. Kabardaeva, O. N. Mustafaev, O. S. Pavlenko, N. S. Sadovskaya, V. S. Fadeev, E. A. Zvonova, and I. V. Goldenkova-Pavlova. Expression of Soluble Active Interferon α A in *Escherichia coli* Periplasm by Fusion with Thermostable Lichenase Using the Domain Insertion Approach. *Biochemistry (Moscow)*, 2018, Vol. 83, No. 3, pp. 259-269
5. Elizaveta A. Zvonova, Alexander V. Ershov, Olga A. Ershova, Marina A. Sodomoina, Maksim B. Degterev, Grigoriy N. Poroshin, Artem V. Ereemeev, Andrey P. Karpov, Alexander Yu. Vishnevsky, Irina V. Goldenkova-Pavlova, Andrei V. Petrov, Sergey V. Ruchko, Alexander M. Shuster. PASylation technology improves recombinant interferon- β 1b solubility, stability and biological activity. *Appl Microbiol and Biotech.* (2017) 101:1975–1987
6. Daria V. Vasina, Orkhan N. Mustafaev, Konstantin V. Moiseenko, Natalia S. Sadovskaya, Olga A. Glazunova, Alexander A. Tyurin, Tatiana V. Fedorova, Andrey R. Pavlov, Tatiana V. Tyazhelova, Irina V. Goldenkova-Pavlova, Olga V. Koroleva. The *Trametes hirsuta* 072 laccase

multigene family: genes identification and transcriptional analysis under copper ions induction. Biochimie. 2015. V. 116. P. 154-164

7. A. A. Tyurin, N. S. Sadovskaya, Kh. R. Nikiforova, O. N. Mustafaev, R. A. Komakhin, V. S. Fadeev, I. V. Goldenkova-Pavlova. *Clostridium thermocellum* thermostable lichenase with circular permutations and modifications in the N-terminal region retains its activity and thermostability. Biochimica et Biophysica Acta. 2015. V. 1854. P. 10-19.

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы функциональной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук». 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. тел+7 (499) 678-53-56
E-mail: irengold58@gmail.com

(подпись)
Ирина Васильевна

Подпись Голденковой-Павловой И.В. «зав»

Ученый секретарь ИФР РАН,

Рбакова