

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Казиевой Екатерины Дмитриевны
«Новые устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы, улучшающие
продукцию изопрена клетками *Pantoea ananatis*», представленную на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03. –
молекулярная биология

Диссертационная работа Казиевой Е.Д. посвящена исследованию одного из ключевых ферментов мевалонатного пути – мевалонаткиназы. Мевалонатный путь является одним из основных путей биосинтеза изопреноидов и их производных в живой природе. Данная группа природных соединений очень разнообразна и включает важнейшие метаболиты клетки, входящие в состав дыхательной цепи, гормоны, витамины, антиоксиданты, пигменты и т.д. Кроме того, изопрен и его производные могут служить основой для синтеза большого количества соединений, используемых в промышленности, биотехнологиях и медицине. Мевалонаткиназа осуществляет реакцию фосфорилирования мевалоната на пути биосинтеза изопентенилпирофосфата и, как было показано, именно от активности этого фермента может значительно зависеть выход различных метаболитов данного биосинтетического пути. При этом используемые в биотехнологиях варианты мевалонаткиназы являются неоптимальными с точки зрения производства конечного продукта, так как их активность ингибируется продуктами реакции. В связи с этим, задача поиска новых вариантов мевалонаткиназ, устойчивых к ретроингибированию, является очень актуальной как с фундаментальной точки зрения – для понимания механизмов регуляции этого важнейшего биосинтетического пути у различных организмов, – так и с практической, для создания новых биопродукторов изопрена и его производных. Представленная к защите работа является важным вкладом в решение этих задач. Стоит сразу же сказать, что в результате проведенных исследований удалось не только найти и охарактеризовать новые варианты мевалонаткиназ, устойчивых к ретроингибированию, провести анализ особенностей их структуры и генетического окружения, но и получить на их основе штаммы-биопродукторы изопрена, причем для решения этой последней задачи были разработаны новые подходы к генетической инженерии используемых бактерий.

Диссертация Казиевой Е.Д. изложена на 137 страницах и включает в себя следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы, Список сокращений, Список цитируемой литературы,

содержащий 315 ссылок, и Приложение. Ниже кратко рассмотрены основные разделы работы и приведены некоторые замечания по каждому из разделов.

Обзор литературы посвящен рассмотрению процессов биосинтеза предшественников изопrenoидов. Основное внимание уделено детальному описанию ферментов мевалонатного пути, включая мевалонаткиназу. Кроме того, рассмотрен альтернативный метилэритритолфосфатный путь биосинтеза изопrenoидов у бактерий, а также возможности использования бактерий *Escherichia coli* и *Pantoea ananatis* для биопroduкции изопrenoидов и других соединений. В качестве основного недостатка обзора необходимо отметить не всегда понятные описания особенностей работы тех или иных ферментов — вероятно, это связано со сложностями перевода статей-первоисточников (см. также ниже). Вместе с тем, обзор содержит очень подробную информацию об основных путях биосинтеза изопrenoидов и может представлять большой интерес для специалистов в этой области.

В разделе Материалы и Методы описаны использованные в исследованиях штаммы бактерий, плазмиды, стандартные методики молекулярной генетики, биохимии и молекулярной биологии, включая молекулярное клонирование, методы выделения и очистки белков, а также достаточно изощренные технологии генетической инженерии бактерий. В то же время, описание анализа кинетических характеристик ферментов стоило бы сделать более подробным (см. ниже). Стоит отметить, что работа выполнена с использованием широкого спектра как классических методов, так и их оригинальных модификаций, в особенности ценным для последующих исследований является описание создания штаммов-продуцентов.

В разделе Результаты и их обсуждение детально описаны выполненные эксперименты и представлено обсуждение полученных результатов в контексте известных данных о структуре мевалонаткиназы, основных путях биосинтеза изопrenoидов и их генетической регуляции. Работа включала в себя «полный цикл» исследований, начиная от филогенетического анализа генов мевалонаткиназы и их генетического окружения, выбора перспективных ферментов для дальнейших исследований, клонирования и очистки белков, тестирования их каталитической активности и анализа ингибирования различными аналогами продуктов данного биосинтетического пути, до создания новых штаммов *Pantoea ananatis*, являющихся продуцентами изопрена и их детальной характеристики. Можно отметить следующие наиболее важные результаты.

- 1) Получены новые варианты мевалонаткиназ, которые обладают значительно лучшими кинетическими характеристиками по сравнению с известными ферментами.
- 2) Показано, что эти мевалонаткиназы устойчивы к ретроингибированию продуктами реакции (причем это коррелирует с наличием в геномах ассоциированных с ними белков, функции которых еще предстоит выяснить). Эти результаты показывают перспективность использованного подхода для получения более эффективных вариантов ферментов для самых различных биотехнологий.
- 3) Разработаны новые подходы к генетической инженерии бактерии *P. ananatis*, на основе систем рекомбинации фага лямбда, которые позволяют получать большой набор штаммов с одновременной интеграцией нескольких различных генных кассет в целевые локусы хромосомы. Использование такого комбинаторного подхода потенциально позволяет «в один прием» получать штаммы с различными уровнями экспрессии тех или иных метаболитов. Необходимо отметить, что конструирование штаммов методами генетической инженерии, несомненно, является сильной стороной данной работы.

В целом, представленная к защите диссертация представляет собой целостное законченное исследование. Результаты работы обладают несомненной оригинальностью и важны как для понимания механизмов функционирования мевалонаткиназного биосинтетического пути, так и для разработки новых биотехнологий на его основе. В то же время, диссертационная работа не лишена недостатков, которые касаются как оформления рукописи, так и содержания конкретных экспериментов и их обсуждения. Основные замечания описаны ниже.

- 1) К сожалению, рукопись содержит достаточно большое количество опечаток и текстовых ошибок. Особенно это касается Обзора литературы, в котором отдельные предложения и даже целые разделы трудны для понимания. Вероятно, это связано с неудачным переводом соответствующих мест с английского языка. Несколько примеров:

«Таким образом, Asp-204 находится в предсказанном положении для содействия переноса фосфорила, и расположения мевалоната в вакантном кармане, для чего субстрат создает пространственную ориентацию комплекса, объясняющую функцию Asp-204.»

«N-конец белка содержит вариацию на мотиве Р-петли, задействованной в связывании АТР.»

«Оценка ЯМР констант равновесного связывания находились в обоснованном соответствии с оценками сродства при исследовании кинетических характеристик. Динамические результаты были интерпретированы в контексте участков, которые могут воздействовать на закрытие домена, что хорошо известно для NMP-киназ подобных белков. В отличие от наблюдения за сопоставимыми конформационными изменениями, зависящими от АТФ или АДФ, консервативно замещенный аналог AMPNP1 индуцирует достаточный размер химического сдвига сигнала ЯМР, затрудняя оценку влияния активного сайта на гамма-фосфорильную часть аденинового нуклеотида.»

«Возникающая жесткость, предложенная по результатам этих динамических исследований, представляется разумной в контексте существенных структурных изменений, документированных для NMP киназных белков.»

«Активный пентамер воды отмечается как сильно взаимодействующий с реакционноспособными группами связанного субстрата и аналогом АТФ.»

«N-концевое назначение Р-образной петли, которое было предметом более ранних функциональных исследований (Herdendorf, Miziorko, 2006), было подтверждено в структуре РМК человека.»

«Это согласуется с наблюдаемым большим вкладом в каталитическую эффективность, а также с позиционной гомологией с предлагаемым общим основным катализом как у MVK.»

«Впервые этот тип изомеразы был обнаружен у *Streptomyces* sp. CL190 и *Staphylococcus aureus* и показана его потребность в FMN и NADPH в дополнение к катионам двухвалентных металлов при аэробных, а также в анаэробных условиях».

2) Наиболее существенные замечания к экспериментальной части касаются измерений и расчетов кинетических параметров исследуемых ферментов, а также анализа ингибирования их активности. В частности, для всех экспериментов необходимо указывать все условия реакции, включая концентрации субстратов и ферментов, времена реакции, способы расчета K_m , V_{max} и k_{cat} и т.д. К сожалению, многие из этих данных не представлены ни в Результатах, ни в Материалах и методах. Для части экспериментов не указано число повторностей, а также ошибки измерений. Большинство измерений K_m и V_{max} (Рис. 17, Табл. 7) выполнены только при трех концентрациях субстратов (иногда четырех), что недостаточно для надежного построения кривых Михаэлиса-Ментен (кстати, как проводили подгонку кривых, действительно по уравнению Лайнуивера-Берка – тогда где линейные графики? – или с помощью

нелинейной регрессии?). В связи с этим, полученные данные об отличиях мевалонат-киназ от ранее охарактеризованных ферментов носят скорее качественный, чем количественный характер и сравнение их кинетических параметров нужно делать с осторожностью. Можно говорить о том, что эти ферменты действительно более активны (K_m ниже, а V_{max} выше), но для того, чтобы сказать, во сколько точно раз, нужны дополнительные измерения.

- 3) То же самое касается анализа влияния ингибиторов на активность мевалонаткиназ (Табл. 8). Так как в таблице не приведены ошибки измерений, нельзя говорить о том, что DPM и DMAPP вызывают «небольшое снижение активности» мевалонаткиназы *M. mazei* (активность составляет 85% и 91% относительно активности в отсутствие ингибиторов), а GPP ее не ингибирует (активность 96%). То же самое можно сказать и про Табл. 9, в которой показано накопление изопрена при ферментации: так как приведены результаты единичного опыта, непонятно, насколько достоверны выявленные различия (которые составляют 20%).
- 4) Из эксперимента на Рис. 18 не следует, что некоторые мевалонаткиназы подвержены ингибированию продуктом реакции, а некоторые – нет. На рисунке показана кинетика превращения субстрата реакции, которая действительно имеет несколько разный вид для разных ферментов, но при этом, судя по всему, в ходе реакции весь субстрат расходуется полностью, так что более сильное замедление реакции для одного из ферментов (MVK^{mut}) может быть связано, например, с более высокой K_m для субстрата, а не с ингибированием продуктом реакции.
- 5) Как уже сказано выше, многие детали экспериментов требуют уточнения: например, как вычисляли k_{cat} (времена реакций, концентрации ферментов, формулы), как определяли удельную активность (Табл. 7), какие были концентрации субстратов, ферментов, времена и какая доля субстрата израсходована на Рис. 18, как определяли активность ферментов в Табл. 8 и т.д. Описания некоторых методик, штаммов и плазмид в Материалах и методах выполнены небрежно, например: «Экспрессионный вектор (Cat. No. 69740-3) на основе системы, полимеразы фага T7. Содержит C-концевую His•Tag®.»; «pET-28b с клонированной *M. paludicola* SANAЕ MCP_1639 Гис6 сигналом»; непонятно, какой состав имела итоговая среда при ферментации (раздел 3.5.1, в Табл. 6 указано две среды); неясен режим разрушения клеток ультразвуком (с.

70: «Затем клетки были разрушены ультразвуком (TOMY UD-201) при 3.5»); странно выглядит описание связывания образцов с колонкой (с. 70: «разрушенные клетки адсорбировали на колонке His-SpinTrap»). Как уже сказано выше, есть неудачные выражения, опечатки и т.д.: «Клонирование генов на pET векторы», «переклонирован с плазмиды на вектор» (с. 61-62); названия эндонуклеаз рестрикции должны быть написаны прямым шрифтом, а не курсивом.

- 6) Некоторые из экспериментов не описаны в разделе Материалы и методы, хотя на такое описание и есть ссылка в Результатах. Например, нет описания анализа клонов, полученных в результате множественной интеграции, с помощью ПЦР, нет описания определения массы мевалонаткиназы с помощью гель-фильтрации. При этом эти эксперименты достаточно важны, их стоило бы представить в разделе Результаты (сейчас на с. 79 просто сказано, что массы соответствовали димеру или тетрамеру).
- 7) Непонятно, почему белковый состав фракций нерастворимых и растворимых белков на Рисунке 15 выглядит настолько похожим (за исключением полосы целевого белка – может быть, клетки были не полностью разрушены, и поэтому в нерастворимой фракции присутствовали все клеточные белки?). Чему соответствуют обозначения 25 kD и 35 kD?
- 8) Описание экспериментов по использованию модифицированного метода Dual In/Out для конструирования штаммов (раздел 4.2.1) было бы понятнее при наличии дополнительного рисунка или схемы, иллюстрирующей геномные перестройки.
- 9) Некоторые использованные сокращения отсутствуют в Списке сокращений: ПААГ, SDS-PAAG, rpm, и.
- 10) В списке литературы отсутствуют некоторые цитируемые статьи (например, Minaeva et al., 2008).

Хочется пожелать соискателю учесть сделанные замечания и избегать подобных неточностей в своей дальнейшей работе. В то же время, необходимо сказать, что сделанные замечания не снижают общей высокой научной и практической значимости работы.

Результаты диссертационной работы Казиевой Е.Д. опубликованы в двух статьях в рецензируемых журналах, один из них – международный журнал из базы Web of Science (Microbiology). Автореферат диссертации полностью отражает содержание и выводы

работы. В целом, диссертационная работа Казиевой Е.Д. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ в редакции постановления Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г., и является научно-квалификационной работой, в которой получены и охарактеризованы новые варианты ферментов, участвующих в продукции изопрена в микробных клетках. Данные, полученные в диссертационной работе, вносят важный вклад в понимание фундаментальных путей метаболизма в бактериальных клетках, а свойства охарактеризованных в работе мевалонаткиназ делают их перспективным инструментом для создания улучшенных штаммов-продуцентов. Казиева Е.Д., несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Заведующий Лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной генетики Российской академии наук
доктор биологических наук

А.В. Кульбачинский

17.05.2019

123182, г.Москва, пл. Академ
+7(499)196-00-00, e-mail: aku

Собственноручную подпись
Ученый секретарь ИМГ РАН
кандидат биологических наук

Л.Е. Андреева

СВЕДЕНИЯ

об официальных оппонентах по кандидатской диссертации Казиевой Екатерины Дмитриевны «Новые устойчивые к ретровинсованию мевалонаткиназы, улучшающие продукцию изопрена клетками *Ramisco almaris*», представленной на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03. – молекулярная биология

Фамилия, Имя Отчество	Гражданство	Место основной работы	Ученая степень, звание	Шифр специальности	Основные научные труды
Кульбачинский Андрей Владимирович	РФ	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук (ИМГ РАН), г. Москва, заведующий лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов	доктор биологических наук	03.01.03	1. Purov D, Petushkov I, Eysunina D, Murakami KS, Kulbachinskiy A. 2018. «Region 3.2 of the σ factor controls the stability of rRNA promoter complexes and potentiates their repression by DksA.» <i>Nucleic Acids Res.</i> 46(21): 11477-11487. 2. Lisitskaya I, Aravin AA, Kulbachinskiy A. 2018.» <i>DNA interference and beyond: structure and functions of prokaryotic Argonaute proteins.</i> <i>Nat Commun.</i> 9(1):5165. 3. Petushkov I, Eysunina D, Kulbachinskiy A. (2017). "Possible roles of sigma-dependent RNA polymerase pausing in transcription regulation." <i>RNA Biol.</i> 1-5. 4. Petushkov I, Eysunina D, Kulbachinskiy A. (2017). "sigma38-dependent promoter-proximal pausing by bacterial RNA polymerase." <i>Nucleic Acids Res</i> 45(6): 3006-3016. 5. Eysunina D, Turtola M, Purov D, Bass I, Klimašauskas S, Belogurov G, Kulbachinskiy A. (2016). "Lineage-specific variations in the trigger loop modulate RNA proofreading by bacterial RNA polymerases." <i>Nucleic Acids Res</i> 44(3): 1298-1308. 6. Petushkov I, Purov D, Bass I, Kulbachinskiy A. (2015). "Mutations in the CRE pocket of

					bacterial RNA polymerase affect multiple steps of transcription." Nucleic Acids Res 43(12): 5798-5809.
--	--	--	--	--	--

Доктор биологических наук, зав. лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук (ИМГ РАН)

Адрес: 123182, г. Москва, пл. акад. Курчатова, тел. (499)-196-
E-mail: akulb@img.gas.ru

Ученый секретарь ИМГ РАН
кандидат биологических наук
М.П.



Кульбачинский Андрей Владимирович

Андреева Людмила Евгеньевна