



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

«УТВЕРЖДАЮ»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

15-05-2019
На № 417/144

№ 85-01-19/408
от 04.04.2019г.

Заместит

научной

«Фундам

биотехн

д.б.н. Ф

« 16

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности диссертации 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.

Актуальность темы выполненной работы

Работа Казиевой Е.Д. является исследовательской работой, посвященной обнаружению и изучению новых устойчивых к ретроингибированию мевалонаткиназ из *M. concilii* и *M. paludicola*, обладающих улучшенными кинетическими параметрами, по сравнению с описанной ранее мевалонаткиназой из *M. mazei*. Ретроингибирование мевалонаткиназ является важным этапом в механизме регуляции биосинтеза предшественников изопреноидов в широком круге организмов и представляет собой существенное препятствие при конструировании высокоэффективных микробных штаммов-продуцентов этого, одного из самых многочисленных, класса веществ.

Меловаткиназа (MVK) является ключевым ферментом мевалонатного пути, приводящего к накоплению в клетках изопентенилпирофосфата и диметилаллилпирофосфата – универсальных предшественников биосинтеза холестерина и нескольких десятков тысяч изопреноидов, в числе которых гормоны, пигменты, защитные и сигнальные молекулы, антиоксиданты и витамины. Следует также отметить, что меловаткиназа является важным ферментом в биохимических процессах, протекающих в организме человека. Так, дефицит мевалонаткиназы, определяющийся как генетическое заболевание, приводит к понижению уровня трансформации мевалоновой кислоты в фосфомевалановую, что клинически проявляется в периодическом повышении температуры тела (синдром периодической лихорадки или гипер IgD синдром). Тяжелые

формы этой болезни могут приводить к опасным для жизни приступам лихорадки в младенчестве, нарушению зрения, задержке в развитии и повреждению почек.

В связи с этим, клонирование и сравнительное изучение свойств мевалонаткиназ из архей (*M. concilii* и *M. paludicola*) и их аналога из клеток человека может способствовать не только детальному пониманию молекулярных основ ферментативной активности этих белков, но и предопределить варианты быстроразвивающихся генно-терапевтических подходов к лечению синдрома периодической лихорадки.

Помимо несомненной практической ценности использования данных, устойчивых к ретроингибированию мевалонаткиназ, которая была продемонстрирована в рецензируемой работе, экспериментально было доказано преимущество этих мевалонаткиназ для продукции изопрена клетками *Pantoea ananatis*. Детальное изучение структурных особенностей именно этих, обнаруженных Казиевой Е.Д. мевалонаткиназ из *M. concilii* и *M. paludicola*, имеет большой научный потенциал и может способствовать прогнозированию свойств других мевалонаткиназ, включая и фермент-аналог человека, т.е. может предопределять прогностический потенциал в медико-генетических исследованиях.

Вторым, не менее важным, аспектом исследования, проведенного Казиевой Е.Д., является разработка способа получения изопрена на основе микробиологического процесса культивирования клеток рекомбинантного штамма-продуцента *Pantoea ananatis*. Предложенный автором подход к получению этого промышленно-важного соединения, являющегося ценным химическим сырьем в производстве синтетических изопреновых каучуков и бутилкаучука, является во многом новым. В настоящее время существуют три основных способа получения изопрена, но во всех случаях в качестве исходных веществ используют, без исключения, нефтепродукты, что, с учетом роста цен на нефть и ограниченность ее запасов, ставит перед исследователями задачу поиска альтернативных вариантов синтеза этого пока незаменимого продукта. Таким вариантом и явился сконструированный в работе Казиевой Е.Д. оригинальный штамм-продуцент изопрена на основе клеток *P. ananatis*, который может послужить основой для создания биотехнологического процесса, несущего все признаки «зеленой химии».

В процессе конструирования высокопродуктивных штаммов встает задача увеличения активности генов пути биосинтеза целевого продукта, одним из простейших решений которой может быть введение дополнительных копий гена в хромосомную ДНК бактерии. В связи с этим, не менее актуальной задачей является разработка и усовершенствование генетического инструментария, позволяющего быстро и эффективно осуществлять множественную модификацию генома, что даёт возможность обеспечить баланс активностей ферментов биосинтетического пути конкретного соединения. В связи с этим задача совершенствования существующих и разработка новых генно-инженерных подходов для интеграции рекомбинантной ДНК в геном клетки-хозяина, которую диссертант поставил и успешно решил, не утратила своей актуальности и в настоящее время.

Все вышеуказанное и определяет как актуальность темы выполненного Казиевой Е.Д. исследования, так и его результатов.

Научная новизна исследования и достоверность, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации.

Научную новизну диссертационной работы определяют следующие результаты исследования, впервые полученные соискателем:

В результате биоинформатического анализа гомологов мевалонаткиназы из *M. mazei*, известного фермента, проявляющего устойчивость к ретроингибированию изопреноидами, автором были предложены к изучению новые гены-кандидаты мевалонаткиназ из архей *M. concilii* и *M. paludicola*, потенциально также толерантные к ретроингибированию изопреноидами.

Показано, что все новые, устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы, присутствуют в геноме не как индивидуальные гены, а структурированы в составе оперона генов мевалонатного пути. Этот факт предполагает существование регуляции мевалонатного пути на уровне транскрипции, в отсутствие ингибирования мевалонаткиназы.

С целью детального изучения свойств мевалонаткиназ у различных организмов Казиева Е.Д. предприняла эксперименты по клонированию соответствующих генов из *M. concilii*, *M. paludicola*, *M. mazei*, *N. maritimus* и *S. cerevisiae*, сконструировала экспрессионные плазмиды и провела гетерологичную экспрессию рекомбинантных белков в клетках *E. coli*. Металл-хелатная хроматография позволила автору получить практически гомогенные рекомбинантные мевалонаткиназы и исследовать их ферментативные свойства.

Сравнение устойчивых и чувствительных к ретроингибированию мевалонаткиназ позволило автору предположить, какой мотив полипептидной цепи может определять спектр ингибиторов данного фермента, а также уникальные свойства мевалонаткиназы именно из *M. concilii*. Экспериментально показано, что мевалонаткиназа из *M. concilii* формирует тетрамерную ферментативно активную структуру белка, в отличие от димерной формы, характерной для данного семейства GNMP-киназ. Любопытным фактом, обнаруженным Казиевой Е.Д., является и тот факт, что активность мевалонаткиназы из *M. concilii* существенно (до 20%) возрастает в присутствии диметилаллилпирофосфата – одного из известных ретроингибиторов мевалонаткиназ. Все эти данные не только являются новыми, но и, во многом, определяют дальнейшее направление в структурно-функциональном исследовании мевалонатакиназ, которое может детализировать молекулярно-биологические аспекты проявления активности у этого класса ферментов.

Не менее важным при создании высокоэффективных штаммов-продуцентов на основе микроорганизмов является выбор соотношения числа дополнительных копий конкретных генов в биосинтетическом пути целевого вещества. Казиева Е.Д. в своей работе предложена новая стратегия, позволяющая быстро и эффективно осуществлять интеграцию целевых фрагментов гетерологичной ДНК в состав хромосомы бактерий с получением, в конечном результате, стабильных форм рекомбинантных штаммов с увеличенной продукцией именно за счёт сбалансированной экспрессии генов.

Необходимо также отметить, что автор диссертационной работы не только обосновал возможность более широкого использования клеток *Pantoea ananatis* в

качестве биоплатформы для генетических манипуляций, но и практическими результатами доказал реальность и успешность сформулированного предложения.

Полученные в рецензируемой диссертационной работе результаты хорошо иллюстрированы и их достоверность не вызывает никаких сомнений. Работу Казиевой Е.Д. характеризует грамотно спланированные эксперименты, которые проведены, при необходимости, в нескольких повторах, что позволило автору провести статистическую обработку полученных результатов. В ходе выполнения экспериментальной работы Казиева Е.Д. использовала широкий, но адекватный поставленной задаче, спектр методических подходов: молекулярной биологии, молекулярной генетики, генной инженерии, жидкостной хроматографии, ферментативной кинетики и т.д.

Выводы, сделанные в результате выполнения диссертационной работы, информативны, базируются на полученных экспериментальных данных и полностью им соответствуют. Следует отметить, что их краткость, характеризует Казиеву Е.Д. как зрелого исследователя, способного не только к решению поставленной задачи, но и четкому преподнесению центральных, наиболее существенных, достижений своей научной работы.

Практическая значимость полученных в диссертации результатов и рекомендации по их использованию.

Результаты и выводы диссертационной работы, а также экспериментальные подходы, описанные в диссертационной работе Казиевой Е.Д., целесообразно использовать для проведения фундаментальных исследований, в научных лабораториях, занимающихся генетикой, клеточной инженерией, созданием рекомбинантных штаммов-продуцентов на основе клеток микроорганизмов. Крайне важным является отработанный автором подход к сбалансированному усилению экспрессии генов избранного биосинтетического пути методом их множественной адресной интеграции в бактериальную хромосому с последующей селекцией по целевому признаку.

Предлагаемая в диссертационной работе Казиевой Е.Д. стратегия может быть использована для получения штаммов-продуцентов биологически активных веществ с заданными свойствами на базе *P. ananatis* и высокой эффективностью их продукции.

Следует также упомянуть в качестве практической значимости и сам рекомбинантный штамм-продуцент на основе клеток *P. ananatis*, который можно рассматривать одновременно как источник биосинтетического изопрена, так и в качестве объекта для дальнейшего увеличения его продуктивности или получения широкого спектра изопреноидов.

О содержании диссертационной работы

Диссертационная работа Казиевой Е.Д. написана по традиционному плану и состоит из глав "Введение" (стр.5), "Обзор литературы" (стр. 9 - 48), "Материалы и методы" (стр. 49 - 72), "Результаты и их обсуждение" (стр.74 - 105), "Выводы" (стр. 106), "Список сокращений и условных обозначений" (стр.107 - 108), "Список цитируемой литературы" (стр.109 - 133) и "Приложение" (стр.135 - 137). Диссертация изложена на 137 страницах, материалы иллюстрированы 24 рисунками и 10 таблицами. Список

литературы содержит 314 источников.

В диссертации четко изложены как актуальность предполагаемого исследования, так и его цели. Не менее четко сформулированы и задачи, решение которых было необходимо для достижения поставленных в рамках исследования научно-практических целей. Указаны также основные результирующие положения, выносимые на защиту диссертационной работы (стр.5 - 7).

Обзор литературы тематически тесно связан с исследованием, проведенным в диссертационной работе и в достаточной степени освещает современное состояние изучаемого вопроса. Казиева Е.Д. подробно рассмотрела пути биосинтеза предшественников изопrenoидов, уделив особое внимание ферментам мевалонатного пути биосинтеза предшественников изопrenoидов (ацетоацетил-СоА тiolaза, гидроксиз-метилглутарил-СоА синтаза, гидроксиз-метилглутарил-СоА редуктаза, мевалонаткиназа, фосфомевалонаткиназа, мевалонатдифосфатдекарбоксилаза, изопентенилфосфатизомераза). В этой части следует отметить, что диссертант сумел при рассмотрении роли указанных ферментов не потеряться в изобилии научной информации, выделив самые существенные моменты, необходимые для решения основной задачи – созданию на основе рекомбинантных микроорганизмов эффективных штаммов-продуцентов изопрена.

Особое внимание в литературном обзоре Казиева Е.Д. уделила мевалонаткиназе, рассмотрев как структурные особенности строения этого фермента из различных источников, так и механизм его функционирования и возможным причинам ретроингибирования.

В своей диссертационной работе Казиева Е.Д. не оставила без внимания и успехи других авторов, например, сконструировавших на основе клеток *E.coli* штаммы-продуценты изопrenoидов с использованием гетерологичного мевалонатного пути.

В литературном обзоре также дается достаточно полная характеристика штамма *P. ananatis* AJ13355, принадлежащего к семейству *Enterobacteriaceae*, способного расти при кислом значении pH в присутствии большинства органических кислот и сахаров, а также в практически насыщающих концентрациях L-глутамата. Исходно *P. ananatis* AJ13355 был выделен из почвы чайных плантаций специалистами компании Ajinomoto и относится к I группе безопасности, что позволяет уверенно определить его в качестве биоплатформы для дальнейших генетических манипуляций. Планированию экспериментальной работы по направленной метаболической инженерии с участием именно этого микроорганизма во многом способствует раскрытая и аннотированная последовательность его генома.

Литературный обзор диссертационной работы Казиевой Е.Д. дает исчерпывающее представление об опубликованных данных по теме проведенного исследования и охватывает литературные источники, включая самые актуальные, вплоть до 2018 года.

Раздел "Материалы и методы" содержит детальное описание проведенных экспериментов, приводятся характеристики штаммов и реагентов, использованных в работе. В случае достаточно известных методических подходов, Казиева Е.Д. приводит отсылку к первоисточникам. Все указанное дает возможность утверждать, что

аналогичные эксперименты могут быть легко воспроизведены. Важно также отметить, что решению поставленных задач во многом способствовало использование самого широкого спектра современных методов: генетики, генной инженерии, молекулярной биологии, биохимии, биоинформатики. Описанные в диссертационной работе эксперименты, при необходимости, проведены в повторностях, а числовые результаты, в основной их части, подвергнуты статистической обработке. Следует также отметить, что подавляющая часть исследования выполнена автором лично.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертационной работы Казиевой Е.Д.

Публикации по диссертационной работе (3 источника) составляют 1 международный патент и 2 статьи в зарубежном и российском журналах, входящих в список, рекомендуемый ВАК, и отражают основное содержание работы.

Замечания. Отмечая несомненные достоинства диссертационной работы, ее теоретико-практическую значимость и научную новизну, следует указать на ряд недостатков, которые в большей степени относятся к оформлению самой рукописи.

1. В работе присутствуют опечатки и редакционные погрешности. Например, в самом начале диссертации работы в Оглавлении на стр. 3 пропущена буква «т» в слове «Конструирование».
2. Не все сокращения приведены в соответствующем списке (например, сокращение GHMP-киназы)
3. При отмеченном выше стремлении автора к статистической обработке результатов, не показаны доверительные интервалы на рисунках 17 и 18 (стр.81 и 84, соответственно)
4. Можно рекомендовать автору более критично относиться к приведенным численным величинам, получаемым в результате деления (или умножения) промежуточных значений. Например, в таблице 7 (стр.82) приведены значения k_{cat}/K_m -Mev с точностью до тысячных долей, хотя сам инструментальный подход уже при определении k_{cat} и K_m -Mev явно не позволяет провести измерения со столь высокой точностью.
5. В связи с заявленной темой диссертации и при наличии очищенных рекомбинантных мелавонаткиназ удивляет отсутствие численных характеристик (констант) их ингибирования. Данный показатель автор приводит только феноменологически и никак не пытается объяснить любопытный факт возрастания ферментативной активности мелавонаткиназы из *M.concillii* в присутствии 5mM DMAPP
6. При оформлении рукописи полезно было бы делать промежуточные выводы после очередных глав и подглав (например, после Литературного обзора), которые в сжатой форме акцентировали бы внимание читателя на осмысленность и обоснованность выбора дальнейшего пути исследования.

Все высказанные замечания являются минорными, направленными на улучшение преподнесения материалов диссертационной работы и никак не умаляют общей высокой положительной оценки основных научных и практических результатов диссертационной работы.

Заключение.

Совокупность результатов анализа рецензируемой работы позволяет утверждать, что диссертационная работа Казиевой Екатерины Дмитриевны на тему: «Новые устойчивые к

ретроингибированию мевалонаткиназы, улучшающие продукцию изопрена клетками *Pantoea ananatis*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук является цельным законченным самостоятельным научно-квалификационным исследованием, направленным на решение актуальной задачи. Результаты диссертационной работы, во многом новые, имеют существенное теоретическое и практическое значение для современной генетики, биохимии, генетической и клеточной (микроорганизмы) инженерии, молекулярной биологии. Его автор – Казиева Е.Д. – в ходе выполнения данного исследования проявила себя как высококвалифицированный исследователь, способный не только к решению поставленной задачи, но и формулировке последующих направлений в выяснении деталей изучаемого явления. Все указанное позволяет уверенно заявить, что диссертационная работа Казиевой Екатерины Дмитриевны «Новые устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы, улучшающие продукцию изопрена клетками *Pantoea ananatis*» соответствует всем требованиям п.9 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. №842 (в редакции Постановления Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Отзыв на диссертационную работу Казиевой Е.Д. был доложен, обсужден и одобрен на заседании совместного семинара лабораторий «Молекулярной инженерии», «Биотехнологии ферментов», «Молекулярных основ биотрансформаций» и «Экологической и эволюционной биохимии», протокол №7 от 13 мая 2019г.

Заведующий лабораторией Биотехнологии ферментов
ФИЦ Биотехнологии РАН,

г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2

119071 Российская Федерация

доктор химических наук, профессор

Тел.: 8(495) 954-52-83

E-mail: apsinityn@gmail.com

А.П.
Синицын А.П.)

Подпись Синицына А.П.

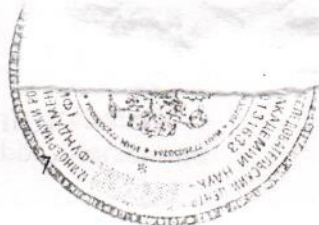
УДОСТОВЕРЯЮ

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН

кандидат биологических наук

(Орловский А.Ф.)

«16» мая 2019г.



В Диссертационный совет Д.217.013.01

НИЦ «Курчатовский институт – ГосНИИгенетика»

СВЕДЕНИЯ

о ведущей организации

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.

Полное наименование организации	Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
Сокращенное наименование организации	ФИЦ Биотехнологии РАН
Организационно-правовая форма	Федеральное государственное учреждение науки
Ведомственная принадлежность	Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Почтовый индекс и адрес организации	119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2
Электронная почта организации	info@fbras.ru
Официальный сайт организации	http://fbras.ru
Телефон организации	8(495) 954-52-83
Факс организации	8(495) 954-27-32
Директор организации	ВРИО Директора: Садыхов Эльчин Гусейнгулу оглы, к.х.н., специальность 03.00.04 – «Биохимия»

Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет.

1. Konstantin M. Boyko, Timur N Baymukhametov, Yury M Chesnokov, Michael Hons, Sofya V Lushchekina, Petr V Konarev, Alexey V Lipkin, Alexandre L Vasiliev, Ph.D. Patrick Masson, Vladimir O Popov, Michail V Kovalchuk 3D structure of the natural tetrameric form of human butyrylcholinesterase as revealed by cryoEM, SAXS and MD. *Biochimie*. (2019), 156, 196-205. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.10.017.
2. Волчок А.А., Шашков И.А., Сатрутдинов А.Д., Бушнев С.О., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Сеницын А.П. Оптимизация условий получения ферментных препаратов на основе рекомбинантных штаммов *Penicillium verruculosum* для использования в кормопроизводстве. // *Актуальная биотехнология*. 2018., № 3 (26), с. 546-546).
3. Atroshenko D., Shelomov M., Zhgun A., Avdanina D., Eldarov M., Pometun A., Chubar T., Savin S., Tishkov V. Preparation and characterization of wild-type and mutant D-amino acid oxidases from *Hansenula polymorpha* and *Trigonopsis variabilis*. // *FEBS Open Bio*. 2018. v. 8, p. 190-190. (doi 10.1002/2211-5463.12453).

4. Fedorov A.N., Yurkova M.S. Molecular Chaperone GroEL – toward a Nano Toolkit in Protein Engineering, Production and Pharmacy. // NanoWorld Journal. 2018. v. 4, № 1, p. 8-15. (doi 10.17756/nwj.2018-053).
5. Ivanova Anastasia A., Carl-Eric Wegner, Yongkyu Kim, Werner Liesack, Svetlana N. Dedysh Metatranscriptomics reveals the hydrolytic potential of peat-inhabiting Planctomycetes. // Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. 2018. v.111, № 6, p. 801-809. (doi 10.1007/s10482-017-0973-9).
6. Dotsenko A.S., Dotsenko G.S., Senko O.V., Stepanov N.A., Lyagin I.V., Efremenko E.N., Gusakov A.V., Zorov I.N., Rubtsova E.A. Complex effect of lignocellulosic biomass pretreatment with 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid on various aspects of ethanol and fumaric acid production by immobilized cells within SSF, Bioresource Technology, 2018, v.250, p.429-438
7. Bashirova A., Pramanik S., Volkov P., Rozhkova A., Nemashkalov V., Zorov I., Gusakov A., Sinitsyn A., Schwaneberg U., Davari M. Disulfide bond engineering of an endoglucanase from *Penicillium verruculosum* to improve its thermostability. International Journal of Protein Engineering, Production and Molecular Science, 2019, v.20, 1602, doi.org/10.3390/ijms20071602
8. Semenova M.V., Gusakov A.V., Volkov P.V., Matys V.Yu., Nemashkalov V.A., Telitsin V.D., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. Enhancement of the enzymatic cellulose saccharification by *Penicillium verruculosum* multienzyme cocktails containing homologously expressed lytic polysaccharide monooxygenase, Molecular Biology Reports, <https://doi.org/10.1007%2Fs11033-019-04693-y>
9. Zanello P.P., Sforza S., Dossena A., Lambertini F., Bottesini C., Nikolaev I.V., Koroleva O., Ciociola T., Magliani W., Conti S., Polonelli L. Antimicrobial activity of poultry bone and meat trimmings hydrolyzates in low-sodium turkey food. -Food & Function, 2014, v. 5, № 2, pp. 220-228 (DOI: 10.1039/C3FO60454C)
10. Mardanov E.S., Blokhina E.A., Tsybalova L.M., Peyret H., Lomonossoff G.P., Ravin N.V. Efficient transient expression of recombinant proteins in plants by the novel pEff vector based on the genome of Potato Virus X. — Front. Plant Sci. 2017, 8: 247
11. Kalenov, Sergei V., Baurina, Marina M., Skladnev, Dmitry A., Kuznetsov, Alexander Ye. High-effective cultivation of *Halobacterium salinarum* providing with bacteriorhodopsin production under controlled stress. Journal of Biotechnology. 2016. v. 233 . p. 211-218. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.07.014.

Ведущая организация подтверждает, что соискатель и его научный руководитель не являются ее сотрудниками, а также в ведущей организации не ведутся научно-исследовательские работы, по которым соискатель ученой степени является руководителем или работником организации-заказчика или исполнителем (соисполнителем).

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН,
кандидат биологических наук

____ (Орловский А.Ф.)

МП