

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 217.013.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ ПРОМЫШЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ
НАЦИОНАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА КУРЧАТОВСКИЙ
ИНСТИТУТ» (НИЦ «КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ» - ГОСНИИГЕНЕТИКА) ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

решение диссертационного совета от 4 июня 2019 г. № 25

о присуждении Казиевой Екатерине Дмитриевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Новые устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы, улучшающие продукцию изопрена клетками *Pantoea ananatis*» по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология» принята к защите 2 апреля 2019 г., протокол № 246 диссертационным советом Д 217.013.01, созданным на базе НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика (117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1), утвержденного приказом Минобрнауки РФ № 105/НК от 11 апреля 2012 г.

Соискатель Казиева Екатерина Дмитриевна, 1981 года рождения, в 2004 году окончила химический факультет Московского Государственного Университета им. М. В. Ломоносова (МГУ). В 2015 году Екатерина Дмитриевна окончила аспирантуру при НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика и в настоящее время работает младшим научным сотрудником в лаборатории № 3 ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика».

Диссертационная работа выполнена в лаборатории № 3 ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика».

Научный руководитель: Каташкина Жанна Иосифовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории № 3 ЗАО «Научно-исследовательского института «Аджиномото-Генетика»

Официальные оппоненты:

1. д.б.н., профессор, Кульбачинский Андрей Владимирович, заведующий лабораторией Институт молекулярной генетики РАН, г. Москва

2. д.б.н., доцент, Голденкова-Павлова Ирина Васильевна, ведущий научный сотрудник Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация, Институт биохимии имени А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, г. Москва, в своем положительном отзыве, подписанном доктором химических наук, профессором Сеницыным Аркадием Пантелеймоновичем, Заведующим лабораторией Биотехнологии ферментов, указала, что тема диссертации, посвященная обнаружению и характеристике устойчивых к ретроингибированию мевалонаткиназ, которые улучшают продукцию изопрена клетками *Pantoea ananatis*, является неоспоримо востребованной задачей, а также имеет прогностический потенциал для медико-генетических исследований.

Однако отмечая достоинства диссертационной работы и ее практическую значимость, следует отметить некоторые недочеты:

1. В работе присутствуют опечатки и редакционные погрешности. Так в Оглавлении на стр. 3, на строке 11 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 достоверные результаты на рисунках 17 и 18.
4. Можно рекомендовать автору более критично относиться к приведённым численным величинам, полученным в результате деления (или умножения) промежуточных значений. Например, значения $k_{cat}/K_m\text{-Mev}$ приведены с точностью до тысячных долей, хотя сам инструментальный подход уже при определении k_{cat} и $K_m\text{-Mev}$ явно не позволяет произвести измерения со столь высокой точностью.
5. В связи с заявленной темой диссертации и при наличии очищенных рекомбинантных мевалонаткиназ удивляет отсутствие численных характеристик их ингибирования. Данный показатель автор приводит только феноменологически и никак не пытается объяснить любопытный факт возрастания ферментативной активности мевалонаткиназы из *M. concilii* 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.

Вместе с тем, указанные замечания не снижают ценности диссертационной работы, не влияют на ее главные работы и носят рекомендательный характер. По актуальности, научной новизне, фундаментальной и практической значимости диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученой степени», утвержденного постановлением правительства РФ №842 от 24.09.2013 г. в редакции от 28.08.2017 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Соискатель имеет 2 опубликованные работы, в том числе по теме диссертации 2, 1 статья в зарубежном журнале, индексируемом в Web of Science и Scopus , и одна публикация, в рецензируемом научном издании; получен один патент US.

Список научных работ по теме диссертаций:

1. Kazieva E, Yamamoto Y, Tajima Y, Yokoyama K, Katashkina J, Nishio Y. Characterization of feedback-resistant mevalonate kinases from the methanogenic archaeons *Methanosaeta concilii* and *Methanocella paludicola*. Microbiology. 2017;163(9):1283-1291.
2. Mihara Y., Rachi H., Nishio Y., Katashkina J, Kazieva ED, Andreeva IG. Method of producing isoprene monomer. US2015275233(A1).
3. Каташкина Ж.И., Казиева Е.Д., Таджима Е., Машко С.В. Сбалансированная амплификация генов мевалонатного пути повысила продукцию изопрена рекомбинантным штаммом *Pantoea ananatis*. Биотехнология. 2019; 35(2): 4-16

На диссертацию и автореферат поступило 6 **положительных** отзывов :
с Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова от д.б.н. Калебиной,
из Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН от к.б.н. Эльдарова, и к.б.н. Чулкина,
из ЗАО «Научно-исследовательского института «Аджиномото-Генетика».от к.б.н. Крылова
из Института общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН от к.б.н. Беккер.

В трех последних отзывах высказаны незначительные замечания, касающиеся оформления автореферата: отсутствие расшифровки использованных в тексте сокращений и полных родовых названий микроорганизмов, введение в текст названий ферментов с сокращенным обозначением микроорганизмов без их расшифровки.

В положительном отзыве к.б.н. Лаврова ведущего научного сотрудника НИЦ «Курчатовский институт» -ГосНИИГенетика в отмечается ряд замечаний. Неполно раскрыта актуальность разработки процессов микробного синтеза изопреноидов и не указаны преимущества микробного синтеза изопрена перед химическими способами. Отмечены неясности изложения результатов работы. Например, указано, что гены мевалонаткиназы были клонированы 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. Указано, что *«Растворимость рекомбинантных полипептидов могла быть существенно повышена культивированием клеток при пониженной температуре»*, но не сказано, были ли использованы такие условия культивирования. Генетическое окружение мевалонаткиназы 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, просто фрагментами геномов, содержащих интересующие автора мевалонаткиназы, и не иллюстрируют результатов использования STRING, являющегося, по информации разработчиков, пакетом для анализа белок-белковых взаимодействий. Не приведены показатели выхода по глюкозе, достигнутые при замене промотора.

Указанные замечания не снижают ценности данной работы, обоснованности и достоверности представленных экспериментальных результатов.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными интересами и достижениями в области молекулярной биологии, биосинтеза нуклеиновых кислот и белков, генной, белковой и клеточной инженерий, исследований физико-химических свойств белков, позволяющими оценить научную и практическую значимость диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Обнаружены новые устойчивые к ретроингибированию мевалонаткиназы

Определены кинетические характеристики новых мевалонаткиназ.

Разработана линия изогенных модельных штаммов-продуцентов изопреноидов на базе гетерологичного мевалонатного пути, содержащих новые мевалонаткиназы устойчивые к ретроингибированию.

Подтверждено преимущество новых устойчивых к ретроингибированию мевалонаткиназ на увеличение продукции изопрена.

Предложен оригинальный подход сбалансированного увеличения экспрессии генов одновременной амплификацией их дополнительных копий в заранее подготовленные локусы хромосомы с последующей проверкой продукции полученного набора штаммов.

Проведена оптимизация экспрессии дополнительных копий генов мевалонатного пути в результате чего получено увеличение продукции изопрена на 30%.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

Проведен анализ особенностей новых устойчивых к ретроингибированию мевалонаткиназ.

Впервые обнаружено, что мевалонаткиназа из *M.concillii* имеет тетрамерный состав отличный от всего семейства GHMP киназ активных в форме димера;

Обнаружено увеличение активности данного фермента на 20% при добавлении одного из потенциальных ингибиторов DMAPP.

Показано, что сбалансированное увеличение экспрессии генов мевалонатного пути имеет решающее влияние на продукцию изопрена.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

Создана платформа для высокоэффективной продукции изопреноидов с использованием мевалонатного пути с десенсибилизированной мевалонаткиназой, обладающей лучшими кинетическими параметрами по сравнению с ранее описанной устойчивой к ретроингибированию мевалонаткиназой из *M. mazei*.

Определены перспективы применения предложенной стратегии оптимизации экспрессии генов биосинтетического пути, используя высокопроизводительные системы.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

что научные положения и выводы основаны на экспериментальных результатах, полученных с использованием комплекса современных методов генетической и клеточной инженерий, молекулярной биологии и биохимии;

для экспериментальных работ показана воспроизводимость результатов, полученных на сертифицированном оборудовании;

теоретические положения и выводы, изложенные в диссертационной работе, базируются на полученных автором экспериментальных результатах и анализе современных литературных данных;

использованы современные методики сбора и обработки исходной информации, что свидетельствует о высоком методическом уровне.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном планировании исследований, выполнении основной экспериментальной работы, обработке, анализе и обсуждении полученных результатов.

На заседании 4 июня 2019 года диссертационный совет принял решение присудить Казиевой Е.Д. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 11 докторов наук по специальности 03.01.03 –молекулярная биология, участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 15, против - нет, недействительных бюллетеней – 2.

Председатель диссертационного совета

д.б.н., профессор, академик РАН

Дебабов В.Г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., доцент

Воюшина Т.Л.

Дата составления заключения

06.06.19