

О Т З Ы В

официального оппонента, доктора биологических наук Каратаева Геннадия Ивановича на диссертационную работу Лобановой Юлии Сергеевны «**Разработка эффективных методов конструирования бесплазмидных рекомбинантных штаммов коринебактерий на основе элементов бактериофагов**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Актуальность темы исследования.

Диссертационная работа Лобановой Юлии Сергеевны посвящена разработке нового способа интеграции рекомбинантной ДНК в геном промышленно значимой бактерии *C. glutamicum* с использованием элементов двух сайт-специфических и одной гомологичной фаговых систем рекомбинации представляет собой мощный генетический инструмент, позволяющий получить на конечном этапе стабильные рекомбинантные штаммы, не содержащие плазмиды и маркеры антибиотической устойчивости.

Конструирование современных продуцентов – это генетическая перестройка метаболизма, которая приводит к превращению бактерий в биохимическую машину, производящую целевой продукт с минимальными затратами на все остальные жизненно важные процессы клетки. Для решения задачи рациональной оптимизации штаммов и создания эффективных продуцентов применяется технология рекомбинантных ДНК, которая позволяет вести целенаправленную генетическую модификацию, следствием чего является создание эффективных продуцентов на основе *C. glutamicum*. Однако использование плазмидных штаммов в биотехнологических процессах имеет ряд недостатков, связанных как с нестабильностью рекомбинантных штаммов, необходимостью добавления антибиотика для поддержания плазмид, так и с законодательным ограничением в ряде стран на использование в промышленных ферментационных процессах штаммов, содержащих автономно реплицирующиеся плазмиды и маркеры устойчивости к антибиотикам.

Стабильная интеграция экспрессирующихся целевых генов в хромосому отменяет необходимость использования антибиотиков и плазмид для поддержания высокой продукции рекомбинантных белков.

С целью интеграции целевых генов в хромосому *C. glutamicum* были разработаны различные подходы, позволяющие осуществить встраивание фрагментов ДНК как в заранее выбранные, так и в случайные сайты на хромосоме. Однако эти процедуры зачастую требуют много временных и трудовых затрат особенно при последовательной интеграции нескольких копий генов в хромосому.

Использование предложенной автором адаптированной для *C. glutamicum* стратегии Dual-In/Out, позволяющей осуществлять интеграцию в предварительно выбранные участки хромосомы целевых генов/оперонов, представляется перспективным методическим подходом для конструирования штаммов продуцентов. В рамках стратегии Dual-In/Out могут быть разработаны удобные методики, позволяющие объединять несколько целевых генов или их копий в одном штамме. Предложенная стратегия применительно к бактериям *C. glutamicum* до настоящего времени не применялась.

Следует отметить, что, по крайней мере, некоторые из использованных автором систем рекомбинации могут быть использованы для редактирования генома других видов микроорганизмов, а разработанные подходы и генетические конструкции адаптированы для достижения конкретных целей.

Таким образом, актуальность, новизна и научная значимость диссертационной работы Ю. С. Лобановой не вызывает сомнений. Работа имеет и существенное практическое значение, подтверждённое использованием разработанного подхода и генетических конструкций в текущей работе в НИИ «Аджиномото-Генетика» для получения промышленных продуцентов некоторых биологически активных веществ. Вполне вероятно, что, по крайней мере, некоторые из сконструированных плазмид и методов могут быть использованы при конструировании генетически модифицированных бактерий других видов.

Структура диссертации.

Диссертация Ю. С. Лобановой имеет традиционную структуру и содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Список цитируемой литературы (251 источник)». Работа изложена на 145 страницах, включая 21 рисунок и 4 таблицы.

Во «Введении» в строгом соответствии с требованиями ВАК отражена актуальность темы, сформулированы цели и задачи исследования, показана научная новизна и практическая значимость диссертационной работы, а так же положения, выносимые на защиту.

Тематика «Обзора литературы» соответствует направлению экспериментальных разработок диссертации. «Обзор литературы» состоит из пяти разделов: в первом дана общая характеристика бактерии *C. glutamicum*, изложены литературные данные, касающиеся истории открытия, таксономической принадлежности, морфологии и условий культивирования; описаны строение генома, типичные штаммы *C. glutamicum*, преимущества использования *C. glutamicum* в промышленности и продукты микробиологического синтеза, уже полученные на его основе. Во второй части детально и осмысленно рассмотрены работы, освещающие разработку генетических методов и инструментов для генетической

инженерии *C. glutamicum*. Третья часть обзора посвящена гомологичной рекомбинации, где особое внимание уделено описанию наиболее изученных фаговых систем гомологичной рекомбинации: Red системе рекомбинации бактериофага λ и RecET Рас профага *E. coli*. В четвертой части отражено современное представление о бактериофаге Mu и его молекулярных механизмах транспозиции. В пятой части дано представление о сайт-специфической рекомбинации, рассмотрены семейства рекомбиназ и их механизмы, а также описаны наиболее часто используемые сайт-специфические рекомбинационные системы λ Int/Xis/Cre/*loxP*, FLP/FRT. Каждая из охарактеризованных в обзоре систем рекомбинации так или иначе использована автором для решения задач диссертации. Обзор написан логично, хорошим литературным языком и характеризует автора как высококвалифицированного специалиста в области генетики и молекулярной биологии.

Раздел «Материалы и методы» не встречает серьезных замечаний, содержит достаточно подробное описание использованных методов генетической инженерии и свидетельствует о высоком профессионализме автора и способности Ю. С. Лобановой использовать наряду с классическими методами арсенал современных методов молекулярной биологии для получения адекватных результатов.

В разделе «Результаты и обсуждение» приведены и проанализированы результаты проведенных экспериментов. Раздел состоит из двух крупных глав. Первая описывает морфологические характеристики трех коринефагов $\phi 16$, $\phi 673$ и $\phi 674$, в ней так же представлен геномный анализ, проведенный с целью поиска недостающих генетических элементов, необходимых для модификации генома *C. glutamicum*. Вторая глава отражает разработку метода прецизионной интеграции генетического материала на основе Dual-In/Out стратегии для конструирования рекомбинантного штамма *C. glutamicum*. Помимо прочего, в данной главе подтверждается возможность переноса маркированных инсерций методом электротрансформации геномной ДНК в *C. glutamicum*. Продемонстрировано применение стратегии Dual-In/Out для интеграции генов флуоресцентных белков в геном бактерии с последующим их объединением в одном штамме и отражены преимущества разработанного метода.

В разделе «Выводы» суммированы результаты исследования.

Степень достоверности результатов и обоснованности выводов, сделанных автором, а так же научная новизна и практическая значимость исследования.

В работе Ю.С. Лобановой три новых коринефага $\phi 673$, $\phi 674$ и $\phi 16$ были охарактеризованы морфологически, а их геномы впервые полностью секвенированы и частично аннотированы. Представленные данные о трех охарактеризованных в работе фагах содержат значимый объем фактической информации, вносят вклад в расширение знаний об

эволюции и видовом разнообразии коринефагов и окажутся полезными для создания устойчивых к фагам штаммов. Материал, представленный в разделе 1, столь значим, что при более детальном обсуждении, вполне мог бы представить предмет отдельной диссертационной работы. На сколько можно судить из текста диссертации, для автора основная ценность исследования бактериофагов заключалась в идентификации элементов сайт-специфической системы рекомбинации коринефага $\phi 16$ для создания генно-инженерного инструментария, необходимого для решения главных задач исследования, чему и посвящён следующий раздел диссертации.

Во втором разделе сформулирована новая, применительно к *C. glutamicum*, Dual-In/Out стратегия редактирования генома, позволяющая осуществлять интеграцию целевых генов/оперонов в бактериальную хромосому. Разработан дизайн и инструментарий всех планируемых модификаций генома, направленный на создание бесплазмидных безмаркерных рекомбинантных штаммов на основе *C. glutamicum*.

Впервые была продемонстрирована возможность переноса маркированных инсерций, расположенных в локусах, предварительно идентифицированных с помощью Ми-зависимой системы транспозиции, методом электротрансформации геномной ДНК в *C. glutamicum*. Автором была выявлена закономерность, что локусы точек, выбранных Ми-зависимой системой для межмолекулярной транспозиции, способны к более эффективной RecA-зависимой гомологичной рекомбинации по сравнению с произвольно взятыми.

Границы применимости предложенного метода были значительно расширены, демонстрацией возможности переноса модификаций, сконструированных в произвольно выбранных точках хромосомы, посредством электротрансформации геномной ДНК в условиях RecE⁵⁶⁴T экспрессии.

На взгляд оппонента, использованный в данной работе подход представляет значительный научный и практический интерес и может быть рекомендован в качестве полезного инструмента не только для редактирования хромосомы *C. glutamicum*, но возможно и других микроорганизмов. Работоспособность разработанной системы была продемонстрированы на примере создания штаммов *C. glutamicum*, содержащих различное количество копий модельных генов, кодирующих зелёный и красный флуоресцентные белки, уEGFP и TurboRFP, соответственно.

По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы, все в журналах, рекомендованных ВАК.

Замечания к работе.

Диссертационная работа написана понятным литературным языком, хорошо структурирована, снабжена аккуратными рисунками и понятными таблицами. У оппонента нет

замечаний по существу и качеству изложенного материала. В качестве замечаний следует отметить присутствие в тексте некоторых «жаргонизмов». Например: «сконструировать элементы», «фаговый генетический элемент», «элементы сайт специфической рекомбинации», когда речь идёт о структурах или белках, участвующих в генетической рекомбинации. Интеграция, вырезаемого маркера, и т.д. выражения, вероятно, устоявшиеся при использовании в конкретной лаборатории. Не все разделы завершаются выводами по представленным материалам.

Заключение.

Все вышесказанное, безусловно, выдвигает данную работу в число интересных и актуальных современных научных работ, представляемых в качестве кандидатских диссертаций по наукам биологического профиля. Выводы диссертации вытекают из приведенных экспериментальных данных, соответствуют поставленным задачам и логически обоснованы.

Автореферат Ю.С. Лобановой и ее публикации адекватно отражают содержание диссертации.

Потому, несмотря на мелкие и несущественные замечания, имеющиеся у оппонента по материалам диссертации и представленные им в настоящем отзыве, считаю, что по объему проведенных исследований и по значимости полученных результатов работа Ю.С. Лобановой, несомненно, соответствует требованиям, представленным в «Положении о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 N 842 (ред. от 01.10.2018 г., с изм. от 26.05.2020 г.).

Достоверность результатов, полученных автором в рамках проведенных исследований, не вызывает сомнений. Выводы, сделанные автором, адекватны поставленным целям и полученным результатам.

Автор диссертационной работы Ю.С. Лобанова, заслуживает присуждения исковой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Зав. лаборатории генетики бактерий, д.б.н.

Каратаев Г.И.

Подпись официального оппонента заверяю

Ученый секретарь ФГБУ НИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, к.б.н.



Кожевникова Л.К.

26.09.2022