

«Утверждаю»

Заместитель директора по
научной работе

Н.В. Равин

« 16 » июня 2022 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

На диссертационную работу аспиранта

Лобановой Юлии Сергеевны

«Разработка эффективных методов конструирования бесплазмидных рекомбинантных штаммов коринебактерий на основе элементов бактериофагов»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.7 – генетика.

Диссертационная работа Лобановой Ю.С. посвящена разработке нового генно-инженерного подхода направленной модификации генома *C. glutamicum* для создания безмаркерных бесплазмидных рекомбинантных штаммов.

Актуальность работы

Актуальность тематики работы касается в первую очередь объекта исследования - грамположительной бактерии *Corynebacterium glutamicum*. Вид *Corynebacterium glutamicum* является хорошо изученной почвенной бактерией и представляет большое значение для биотехнологии. Микроорганизм широко используется в производстве различных веществ: от биотоплива и полимеров до кормовых добавок и ценных соединений пищевого и фармацевтического назначения. В промышленном производстве существует постоянная необходимость в штаммах с улучшенными продуцирующими свойствами, в связи с чем разработка новых удобных и эффективных методов для редактирования генома *C. glutamicum* является актуальной задачей.

Часто в процессе конструирования высокопродуктивных штаммов встает задача повышения активности ферментов пути биосинтеза целевого продукта, одним из простейших решений которой может быть введение дополнительных копий соответствующих генов в составе плазмид или путем интеграции дополнительных копий необходимых генов непосредственно в геном бактерии. Последний способ является более предпочтительным в настоящее время в связи с существующим запретом на использование плазмид при создании промышленных штаммов. Таким образом, разработка генно-инженерного инструментария для интеграции гетерологичной ДНК в хромосому *C. glutamicum* с целью

получения бесплазмидных безмаркерных штаммов-продуцентов является актуальной и практически значимой задачей.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа построена по общепринятому плану и содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждения», «Выводы» и «Список литературы». Во введении сформулированы актуальность, цели и задачи работы, обозначены научная новизна и практическая значимость. Глава «Обзор литературы» состоит из 5 разделов и подробно описывает общую характеристику *C. glutamicum*, методы генетической инженерии коринебактерий, основные механизмы гомологичной и сайт-специфической рекомбинации, а также механизмы транспозиции бактериофага Mu.

Глава «Материалы и методы» содержит полное описание методов молекулярной генетики, микробиологии, методов работы с бактериофагами, применявшихся при выполнении данной работы.

Глава «Результаты и обсуждения» состоит из 2 разделов. Первый раздел содержит характеристику трех коринефагов. Во втором разделе описывается разработка метода прецизионной интеграции генетического материала на основе Dual-In/Out стратегии для конструирования рекомбинантного штамма *C. glutamicum*. В разделе «Выводы» сформулированы основные выводы исследования, соответствующие поставленным задачам.

Работа изложена на 145 странице, содержит 21 рисунок и 4 таблицы. Библиографический указатель содержит 251 источник.

Научная новизна и практическая значимость исследования

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

Ранее разработанная для грамотрицательных бактерий стратегия Dual-In/Out была модифицирована и впервые адаптирована для направленной модификации генома *C. glutamicum*. Предложенная стратегия позволяет осуществлять прецизионную интеграцию целевых генов/оперонов в бактериальную хромосому. В ходе поиска новых фаговых генетических элементов для модификации генома *C. glutamicum* три новых коринефага $\phi 673$, $\phi 674$ и $\phi 16$ были охарактеризованы морфологически, а их геномы впервые полностью секвенированы и частично аннотированы. Новый генно-инженерный инструментарий был сконструирован на основе идентифицированных элементов сайт-специфической системы рекомбинации коринефага $\phi 16$. На примере интеграции вырезаемого маркера, фланкированного *attL/R _{$\phi 16$}* -сайтами, была впервые продемонстрирована способность укороченного варианта экзонуклеазы RecE⁵⁶⁴ совместно с полноразмерной рекомбиназой RecT Rec профага осуществлять рекомбинацию между линейным фрагментом и кольцевой хромосомой

C. glutamicum. Отдельные генно-инженерные инструменты на основе $\text{RecE}^{564\text{T}}$ -зависимой гомологичной и двух сайт-специфических систем рекомбинации коринефага $\phi 16$ и Cre/lox фага P1 были объединены в стратегию Dual-In/Out для конструирования безмаркерного рекомбинантного штамма *C. glutamicum*. Возможность переноса маркированных инсерций методом электротрансформации геномной ДНК была впервые продемонстрирована в *C. glutamicum*. Также была выявлена взаимосвязь между точками, выбранными Mu -зависимой системой для межмолекулярной транспозиции, и способностью этих локусов к эффективной RecA -зависимой гомологичной рекомбинации. Было показано, что эффективность переноса модификаций, сконструированных в произвольно выбранных точках хромосомы, посредством электротрансформации геномной ДНК может быть существенно увеличена в условиях $\text{RecE}^{564\text{T}}$ экспрессии.

Однако, несмотря на высокий научный и методический уровень, работа не лишена определенных недостатков.

Прежде всего, остается неясным, с какой целью диссертантом была проведена работа по морфологической характеристике коринефагов $\phi 673$ и $\phi 674$ и секвенированию их геномов. Эти фаги являются литическими и не содержат генов сайт-специфической системы рекомбинации, которые можно использовать для интеграции в хромосому.

Принимая во внимание известную для промышленной микробиологии проблему фаголизиса в результате фаговой инфекции в ходе ферментации, диссертанту следовало бы обсудить вопрос генетической стабильности рекомбинантных штаммов, полученных с использованием генетических элементов фага $\phi 16$, с учетом возможности заражения рекомбинантов соответствующим фагом при их культивировании в заводских ферментерах.

Плазмида $\text{pVC-AmR-Int}\phi 16\text{-SceI}$, используемая в работе как Int -хелпер и способная к IPTG -зависимой самоэлиминации, содержала ген мегануклеазы I-SceI под контролем регулируемого LacI промотора Ptrc-id_2 . На основании работ, на которые ссылается диссертант, этот промотор даже в lacI^{R} штаммах демонстрирует заметную “протечку”. С учетом данного факта автору следовало бы привести оценку эффективности интеграции целевого генетического материала в хромосому реципиентного штамма с использованием этой хелперной плазмиды при учете ее IPTG -независимой самоэлиминации, обусловленной “протечкой” промотора.

В последнее время все большую популярность для направленной геномной инженерии промышленно значимых микроорганизмов и, в том числе, *C. glutamicum*, приобретает применение тех или иных CRISPR/Cas -зависимых систем редактирования. В данной связи, работа однозначно выиграла бы от уточнения автором преимуществ разработанной

им системы в сравнении с подходом хромосомальной рекомбинационной инженерии, использующим CRISPR/Cas-опосредованную контрселекцию.

Высказанные замечания не являются принципиальными, в основном носят дискуссионный характер и не снижают общей высокой оценки работы.

Заключение

Диссертационная работа Лобановой Ю.С. «Разработка эффективных методов конструирования бесплазмидных рекомбинантных штаммов коринебактерий на основе элементов бактериофагов» является завершённой работой, выполненной на высоком методическом уровне с использованием современных молекулярно-генетических методов; ее содержание полностью соответствует всем 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. По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы, все в зарубежных журналах из списка ВАК. Основные результаты работы также представлялись на международной конференции «5th Applied Synthetic Biology in Europe». Автор диссертационной работы заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика.

Отзыв подготовлен доктором биологических наук, заведующим лабораторией геномики микроорганизмов и метагеномики А.В. Мардановым. Отзыв обсужден и одобрен на межлабораторном семинаре ФИЦ Биотехнологии РАН 16 июня 2022г. (Протокол №1)



А.В. Марданов

Подпись А.В. Марданова заверяю:
ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН, к.б.н.

А.Ф. Орловский

16.06.2022

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Адрес: 119071, г. Москва, Ленинский просп., д. 33, стр. 2.

Телефон: +7 (495) 954-52-83

Эл. почта: info@fbras.ru