

О Т З Ы В

официального оппонента, доктора биологических наук Яненко Александра Степановича 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.

Диссертационная работа Лобановой Юлии Сергеевны посвящена разработке современного генетического инструментария для бактерий *Corynebacterium glutamicum*, которые являются важнейшими производственными штаммами для получения разнообразной продукции, востребованной сельским хозяйством, химическим и фармацевтическим комплексами, включая незаменимые аминокислоты, органические кислоты, амины, рекомбинантные белки.

Хорошо известно, что современный генетический инструментарий не является универсальным и, как правило, применим только для ограниченного набора модельных микроорганизмов, прежде всего для *E.coli*. Адаптация этого инструментария для работы с другими видами промышленных микроорганизмов не является тривиальной задачей и требует хорошего знания объекта, виртуозной техники генетического конструирования и доступа к широкому кругу генетических ресурсов. Все это присутствует в данной работе, что и позволило успешно решить все задачи диссертационной работы.

Важнейшими результатами данной работы являются разработка нового способа интеграции фрагментов ДНК в геном коринебактерий с помощью рекомбинантных систем бактериофагов и способа объединения в одном штамме параллельно полученных инсерций посредством введения в клетки геномной ДНК из разных штаммов. Разработанный метод является мощным генетическим инструментом, позволяющим получить на конечном этапе стабильные рекомбинантные штаммы, не содержащие плазмид и маркеров антибиотической устойчивости.

Актуальность темы диссертации

История промышленного применения бактерий *C. glutamicum* насчитывает уже более 60 лет. Несмотря на длительную историю успешного применения *C. glutamicum* в биотехнологии, сохраняется потребность в штаммах с желаемыми производственными свойствами. С учетом этого обстоятельства, разработка новых удобных и эффективных методов для редактирования генома *C. glutamicum* актуальна и по сей день. Для решения задач рациональной оптимизации штаммов и создания эффективных продуцентов применяется методология геномной инженерии с участием плазмидных векторов и генов

устойчивости к антибиотикам, которая обеспечивает получение целенаправленных генетических модификаций. Однако использование плазмидных штаммов в биотехнологических процессах имеет ряд недостатков, связанных не только со структурной и сегрегационной нестабильностью плазмид, влиянием их на метаболизм и необходимостью добавления в среду антибиотика для их поддержания, но также и с законодательным ограничением на использование в промышленных ферментационных процессах штаммов, содержащих автономно реплицирующиеся плазмиды и маркеры устойчивости к антибиотикам в связи с опасностью их распространения в природе.

Разработка генно-инженерных инструментов для интеграции фрагментов ДНК в хромосому *S. glutamicum* с целью получения бесплазмидных безмаркерных штаммов-продуцентов является актуальной и практически значимой задачей. С учетом сказанного актуальность и научная значимость диссертационной работы Лобановой Ю. С. не вызывает сомнений.

Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы

Впервые для промышленно-значимых бактерий *S. glutamicum* разработана комплексная генетическая система направленной модификации генома, позволяющая интегрировать в хромосому, исключать из хромосомы и объединять в одном штамме гены/опероны или их мутантные варианты. Эта система базируется на уникальных фаговых генетических элементах, контролирующих сайт-специфическую рекомбинацию (фаг $\phi 16$ и P1) и гомологичную рекомбинацию (RecET функции Rac фага *E.coli*). Успеху работы способствовала разработанная автором методика межштаммового переноса ДНК с помощью электротрансформации геномной ДНК. И наконец, разработана уникальная технология на основе интегративных функций фага Mu по выявлению в геноме *S. glutamicum* горячих точек рекомбинации, генетический материал в которых эффективно передается при электротрансформации геномной ДНК. В совокупности все эти находки диссертанта позволили создавать бесплазмидные безмаркерные рекомбинантные штаммы *S. glutamicum*, соответствующие всем требованиям безопасности.

Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики

В диссертационной работе Лобановой Ю.С. исследована функциональная активность рекомбинационных систем бактериофагов в клетках коринебактерий. Роль таких систем в изменчивости организмов остается не изученной в полной мере. В то же время лучшее понимание принципов их функционирования позволит создать альтернативные генной инженерии системы управления направленной изменчивостью организмов, основанные на природных естественных процессах, протекающих в клетке.

Результаты данной работы внесли значительный вклад в разработку таких систем направленной модификации для коринебактерий.

С практической точки зрения результаты работы представляют значительный интерес и могут быть рекомендованы к использованию для редактирования хромосомы *S. glutamicum* и получению промышленных штаммов-продуцентов клеточных метаболитов. Автором представлены результаты создания модельных штаммов, содержащих различное количество копий генов, кодирующих зеленый и красный флуоресцентные белки EGFP и TurboRF. Можно только сожалеть, что коммерческая составляющая работы не позволила автору продемонстрировать разработанный метод для решения практических задач по созданию штаммов-продуцентов.

Содержание диссертации

Диссертационная работа Лобановой Ю. С. изложена на 145 страницах, написана по традиционному плану и включает: «Введение»; «Обзор литературы»; «Экспериментальную часть» (Материалы и методы; Результаты и обсуждение); «Выводы»; «Список сокращений и условных обозначений»; «Список цитируемой литературы» (251 источник). В целом диссертация носит завершённый характер, достаточно хорошо иллюстрирована, содержит 21 рисунок и 4 таблицы.

Во «Введении» в строгом соответствии с требованиями ВАК, обоснована актуальность работы, представлены цели и задачи работы, научная новизна и практическая ценность выполненных исследований. В «Обзоре литературы» подробно рассматриваются особенности бактерий *S. glutamicum*, их генетика и преимущества использования *S. glutamicum* в промышленности в качестве продуцентов клеточных метаболитов. Выполнен критический анализ существующих генетических методов и инструментов для метаболической инженерии *S. glutamicum*, включая фаговые рекомбинационные системы, что позволило автору выявить пробелы в имеющемся наборе генетических инструментов и определиться с задачами работы. Обзор литературы свидетельствует о том, что автор хорошо ориентируется в проблеме, способен к критическому анализу и обобщениям. Обзор литературы дополняют иллюстрации хорошего качества.

Раздел «Материалы и методы» содержит детальное описание методов, использованных в работе, так же содержит и ссылки на оригинальные работы, что позволяет воспроизвести эти методики другим исследователям. Следует отметить, что автор использует широкий круг методик: микробиологических, в том числе специальных методик по работе с фагами (φ16, φ673, φ674 и Mu); генно-инженерных, биоинформатических. Особенно впечатляющим является конструирование

рекомбинантных молекул и штаммов с использованием методов Гибсона и фаго-специфических рекомбинационных систем. Все это характеризует диссертанта как универсального ученого с широким диапазоном действия.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из двух неравных частей. Первая часть - посвящена изучению бактериофагов коринебактерий - умеренного $\phi 16$ и вирулентных $\phi 673$ и $\phi 674$ бактериофагов. Впервые геномы этих бактериофагов были секвенированы и аннотированы, что позволило обнаружить новые генетические элементы, которые были в дальнейшем использованы для разрабатываемых систем рекомбинации, а также без сомнения будут использованы другими исследователями, работающими с коринебактериями. Вызывает сожаление, что диссертант очень скупо описал структуру генома бактериофага $\phi 16$, систему лизогении и не провел сравнение с известными бактериофагами, прежде всего λ , которые широко применяются в генетическом конструировании.

Вторая часть является наиболее объемной и содержит все элементы разработки нового метода прецизионной интеграции, исключения и обмена генетическим материалом между штаммами для конструирования штаммов *C. glutamicum* с заданными свойствами.

На основе идентифицированных автором элементов сайт-специфической системы рекомбинации коринефага $\phi 16$ был сконструирован новый генно-инженерный инструментарий для направленной по $attB_{\phi 16}$ интеграции фрагментов ДНК в геном *C. glutamicum* и их вырезания при необходимости. Для удаления из интегрированного фрагмента плазмидной части и маркера, диссертант адаптировала систему сайт-специфической рекомбинации Cre бактериофага P1. Чтобы создать в штаммах искусственные дополнительные $attB_{\phi 16}$ сайты в хромосоме, автор использовал RecET систему гомологичной рекомбинации из Рас профага *E. coli*, при этом существенным образом её модифицировал для эффективной работы в коринебактериях. Для эффективной работы в коринебактериях был впервые использован укороченный вариант RecE⁵⁶⁴, который все еще сохранял экзонуклеазную активность и не был токсичен для клеток. И, наконец, последним элементом созданной системы является разработка метода переноса генетического материала между штаммами с помощью геномной трансформации. И здесь важным усовершенствованием метода явилось использование RecE⁵⁶⁴T для повышения частоты образования рекомбинантных клонов. Совокупность всех этих элементов позволила автору предложить универсальную генетическую систему направленной модификации генома коринебактерий, позволяющую направленно интегрировать в хромосому, исключать из хромосомы и объединять в одном штамме гены/опероны или их мутантные варианты. Еще раз хотелось подчеркнуть, что эта система базируется на уникальных фаговых генетических элементах, контролирующих

сайт-специфическую рекомбинацию (фаг φ16 и P1) и гомологичную рекомбинацию (укороченный вариант RecET функции Rac фага E.coli).

Особый интерес вызывают результаты автора, касающиеся наличия в хромосоме *S. glutamicum* участков - горячих точек рекомбинации. Автором была выявлена закономерность, что локусы, выбранные Mu-зависимой системой при межмолекулярной транспозиции, обладают способностью к эффективной RecA-зависимой гомологичной рекомбинации. Иными словами, модификации, содержащиеся в локусах, предварительно выбранных (отселектированных) с помощью системы транспозиции фага Mu, объединяются в одном штамме при геномной трансформации, а модификации в произвольно выбранных точках – нет.

И здесь необходимо отметить, что сильной стороной диссертационной работы Лобановой Ю.С. является безупречное владение методами конструирования рекомбинантных молекул и одновременное отличное знание биологии изучаемых объектов. Умение сочетать инженерию *in vitro* и *in vivo* является давней традицией ГосНИИгенетика, приводящей к уникальным результатам. Очень похвально, что эту традицию развивают дальше в АО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (АГРИ), институте имеющем с ГосНИИгенетика одно происхождение.

В качестве замечания к разделу «Результаты и обсуждение» следует отметить тот факт, что применимость разработанной системы была продемонстрирована только на примере модельных генов, кодирующих зеленый и красный флуоресцентные белки EGFP и TurboRF. Более того, не представлены доказательства, что конечные штаммы сохранили локализацию встроок исходных штаммов.

Имеются также небольшие замечания редакторского характера. На стр.92 вместо фермента эксциноназа, фермент назван эксизионаза. На стр.101 на рис.12 промотор *garA* обозначен как *darA*.

Но все эти замечания носят скорее рекомендательный характер и не влияют на общую высокую оценку выполненной работы.

Опубликование результатов диссертации в научной печати

Результаты и выводы диссертационной работы Лобановой Ю.С. в полном объеме представлены в печатных работах – 3 статьях, опубликованных в специализированных рецензируемых зарубежных журналах, имеющих высокие рейтинги: две в Archives of Virology (Q2-Q3) – престижный научный журнал в области вирусологии и одна в Applied Microbiology and Biotechnology (Q1), публикующем работы о генетических технологиях конструирования и технологиях микробного синтеза. Материалы диссертации представлялись на международной конференции и отечественных семинарах.

Содержание автореферата

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Лобановой Юлии Сергеевны «Разработка эффективных методов конструирования бесплазмидных рекомбинантных штаммов коринебактерий на основе элементов бактериофагов», имеет существенное значение для развития фундаментальных и прикладных аспектов молекулярной генетики коринебактерий - одного из ключевых объектов микробной биотехнологии и отвечает всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018 г., с изм. от 26.05.2020 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Лобанова Юлия Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Официальный оппонент:

Руководитель Курчатовского комплекса генетических исследований (ГосНИИгенетика)

Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

(123182, пл. Академика Курчатова, 1, Москва, +7 (499) 196–95–39, nrcki@nrcki.ru)

e-mail оппонента: Yanenko_AS@nrcki.ru

доктор биологических наук, профессор

Яненко Александр Степанович

Подпись Яненко А.С. заверяю

Главный ученый секретарь НИЦ «Курчатовский институт»

Сергунова Кристина Анатольевна

«26» сентября 2022 г.

