

## О Т З Ы В

на автореферат диссертации Горшковой Н.В.

«Разработка эффективных методов интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому метилотрофных бактерий и коринебактерий на основе системы транспозиции фага Mu», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - «Молекулярная биология».

Рецензируемая работа посвящена разработке высокоэффективной системы для интеграции рекомбинантных генов в хромосому коринебактерий и метилотрофных бактерий с последующей амплификацией и фиксацией их положения в геноме. Данная система основана на Mu-зависимой транспозиции, используемой ранее для грамотрицательных бактерий. Автор успешно адаптировал ее для грамположительных бактерий. Несмотря на то, что *Corynebacterium glutamicum* используют в промышленности уже на протяжении более чем 50 лет, называя ее «рабочей лошадкой» биотехнологии, разработка новых систем для редактирования ее генома по-прежнему актуальна. Современные требования биотехнологии предполагают использование бесплазмидных штаммов, не несущих маркеров антибиотикоустойчивости, диктующих необходимость разработки методов введения мутаций непосредственно в геном. В настоящее время наиболее широко используемая система для редактирования геномов коринебактерий основана на гомологичной рекомбинации с помощью нереплицирующихся в коринебактериях плазмид. Кроме того, описаны системы редактирования на основе фаговых белков RecE и RecT профага Pac, cre/loxP системы бактериофага P1, двухкомпонентных систем CRISP/Cas9 и CRISPR/Cpf1. Для достижения определенной цели – введения делеции/инсерции, точечных мутации, замены гена или ослабления его функции целесообразно использование той или иной системы редактирования. Предложенная автором схема редактирования является новым инструментом, обеспечивая получение штаммов с несколькими копиями рекомбинантных генов в хромосоме.

Автор впервые показал возможность интеграции и последующей контролируемой амплификации рекомбинантной ДНК в хромосоме грамположительной бактерии *Corynebacterium glutamicum* с помощью фага Mu. Для этого была сконструирована трех-компонентная система: 1). плаزمиды-помощники с генами MuAB факторов транспозиции, способная реплицироваться в штамме-хозяине и элиминирующая из клеток в отсутствие селективного давления; 2). интегративная плаزمиды, содержащая mini-Mu(LR или LER) элемент с последовательностью вводимого гена, фланкированного L и R концами фага Mu и селективные маркеры; 3). плазмиды-помощники с геном cre фага P1, продукт которого – Cre-рекомбиназа позволяет осуществить выщепление mini-Mu (LER) элемента после проведения амплификации введенного в хромосому гена.

Автор показал универсальность метода Mu-зависимой транспозиции на примере 2-х разных штаммов *Corynebacterium glutamicum* – ATCC13869 и ATCC13032 и их производных, а также метилотрофных бактерий *Methylobacterium methylophilus* AS-1 и *Methylobacterium extorquens* AM1. Частота интеграции в коринебактериальные штаммы зависела от штамма-реципиента и оптимизированных условий транспозиции - присутствие энхансера E и его «прямая» ориентация, а также использование сильного индуцибельного промотора lacI<sup>Q</sup>-P<sub>tac</sub> для экспрессии хэлперных функций MuAB значительно увеличило внутривнутрихромосомную амплификацию и множественную транспозицию mini-Mu элементов. Разработанная автором система на основе cre/lox генов фага P1 позволяет вырезать энхансер E, что снижает внутримолекулярную транспозицию, позволяя фиксировать местоположение введенной копии гена.

Достоверность полученных результатов строго доказана автором. Так, множественную транспозицию в геном подтверждают несколько фактов - повышение уровня Sm-устойчивости штамма, увеличение уровня экспрессии флюороресцентных белков и результаты гибридизации по Саузерну.

В качестве замечания можно отметить, что интеграция в хромосому с помощью Mu-векторов может происходить в произвольный локус. Поэтому у

рекомбинантов могут быть повреждены некоторые существенные гены, что потребует дополнительной проверки.

Актуальность поставленных задач и практическая ценность их решений посредством предлагаемых соискателем подходов не вызывает сомнений. При этом разработанные подходы и результаты представляют ценность не только для прикладной молекулярной биологии, но и для молекулярной биологии в целом.

Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне, проделан большой объем экспериментальной работы, результаты, изложенные в диссертации, получены с применением современных молекулярно-биологических методов и не вызывают сомнений. Выводы, сделанные на основании полученных экспериментальных данных, являются четкими и обоснованными. Материалы диссертации докладывались на конференциях и полностью отражены в публикациях.

Подводя итог, можно утверждать, что диссертационная работа Горшковой Н.В. полностью удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по специальности «молекулярная биология», а ее автор заслуживает присуждения искомой степени.

Ведущий научный сотрудник НИЦ «Курчатовский институт»- ГосНИИгенетика,  
кандидат биологических наук  
Рябченко Людмила Евгеньевна  
10.12.2018

**Место работы:** Федеральное государственное  
Государственный научно-исследовательский институт генетики и  
селекции промышленных микроорганизмов Национального  
исследовательского центра «Курчатовский институт»

**Адрес:** 113545 Москва, 1-ый Дорожный пр., д.1  
**Контактный телефон:** +7 (905)770-78-87  
**E-mail:** ryabchenko@genetika.ru

1