

ОТЗЫВ

Научного руководителя о **Н.В. Горшковой**, представившей диссертационную работу «*Разработка эффективных методов интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому метилотрофных бактерий и коринебактерий на основе системы транспозиции фага Ми*» к защите на соскание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

Горшкова Наталья Васильевна работает в ЗАО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ») со дня его основания в 1998 г. по настоящее время в должности младшего научного сотрудника.

За этот период она принимала активное участие в различных исследовательских проектах, связанных с созданием штаммов-продуцентов аминокислот и других биологически активных соединений на основе широкого круга грамотрицательных и грамположительных бактерий. Н.В. Горшкова освоила большое количество современных микробиологических, генетических, молекулярно-биологических и биохимических методов исследования, включая методы культивирования бактерий, выделения хромосомальной и плазмидной ДНК, рестрикционный анализ и методы молекулярного клонирования, ПЦР-амплификацию, Саузерн-гибридизацию. В различных проектах, параллельно с выполнением работ по достижению практически значимого результата, Н.В. Горшкова участвовала в модернизации генетического инструментария для направленной модификации генома промышленно значимых бактерий и созданию рекомбинантных штаммов, не содержащих плазмид и маркеров антибиотической устойчивости. Одним из ключевых объектов исследований Горшковой Н.В., способствовавших развитию генетического инструментария, стала двухкомпонентная система интеграции на основе фага-транспозона Ми, введенная в практику работы АГРИ проф. В.З. Ахвердяном. Адаптация этой системы для целей интеграции рекомбинантной ДНК в геном метилотрофных бактерий *Methylophilus methylotrophus* AS1, проведенная Горшковой Н.В. в соавторстве в Токмаковой И.Л. и под руководством Ю. Йомантаса, стала начальным этапом работы над кандидатской диссертацией. Опыт, новые подходы и методы исследований, накопленные в первых исследованиях Горшковой Н.В., оказались полезны для развития этой системы и ее применения для клеток коринебактерий, а затем и для других метилотрофных бактерий, *Methylobacterium extorquens* AM-1, которыми диссертантка занималась в течение ряда лет в группах С.В. Смирнова, Е.Р. Гака и в сотрудничестве с сотрудниками группы А.А. Крылова. При этом необходимо отметить, что в случае ко-лаборационных контактов с сотрудниками дру-

гих исследовательских групп, а также при обучении начинающих и менее опытных коллег Н.В. Горшкова не только демонстрировала высокий профессионализм, экспериментальное мастерство, самостоятельность и целеустремленность, но и педагогические способности и навыки.

Диссертация Н.В. Горшковой посвящена актуальной проблеме - методу конструирования бесплазмидных рекомбинантных штаммов с амплифицированными копиями целевых генов в хромосоме грамположительной *Corynebacterium glutamicum* и грамотрицательных метилотрофных бактерий *Methylophilus methylotrophus* AS1 и *Methylobacterium extorquens* AM-1. Горшковой Н.В. впервые был предложен способ интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому этих бактерий с последующей амплификацией mini-Mu(LER) элементов с использованием системы репликативной транспозиции фага Mu *E. coli*. Мировая новизна предложенной стратегии состояла в том, что, основываясь на установленной зависимости внутримолекулярной транспозиции mini-Mu(LER) от наличия и ориентации энхансера E относительно MuL/R-концов mini-Mu элемента, удалось дополнить экспериментальную стратегию фиксации элементов в интегрированных точках хромосомы за счет Cre-зависимого удаления E из состава mini-Mu перед последующими актами интеграции/амплификации нового mini-Mu(LER) элемента. Достоинства этой модифицированной стратегии уже отмечены мировыми экспертами в соответствующей области. Конкретные результаты диссертационной работы, а также разработанные элементы генетического инструментария нашли практический выход в текущей работе, использовались для получения продуцентов некоторых биологически активных веществ.

В процессе работы над диссертацией Горшкова Н.В. проявила себя как организованный, добросовестный и ответственный исследователь, работавший с большим интересом и трудолюбием. Горшкова Н.В. критически относится к полученным результатам, умеет обобщать и делать обоснованные выводы при анализе собственных и литературных данных. Она способна самостоятельно ставить и планировать эксперименты, добиваться достижения поставленных целей.

Горшкова пользуется уважением в коллективе, обладает доброжелательным характером, всегда готова оказать помощь в работе.

Материалы диссертации Н.В. Горшковой (в соавторстве) нашли отражение в четырех статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, входящих в международные и отечественные системы цитирования, рекомендуемых ВАК, получен 1 патент, материалы представлены на двух международных конференциях. В публикациях и автореферате отражены все основные положения исследования.

Считаю, что диссертационная работа Горшковой Н.В. является завершенным научным исследованием и соответствует всем требованиям, предъявляемым ВАК к диссертационным работам, а соискатель Горшкова Н.В., безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Научный руководитель
доктор биологических наук, профессор,
Директор по науке,
Заведующий лабораторией ЗАО «АГРИ»

Подпись Машко С.В. удостоверяю
Зам. генерального директора ЗАО «АГРИ»
кандидат биологических наук



СВЕДЕНИЯ

о научном руководителе кандидатской диссертации Горшковой Натальи Васильевны «Разработка эффективных методов интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому метилотрофных бактерий и коринебактерий на основе системы транспозиции фага Mu», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - «Молекулярная биология» (биологические науки)

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, звание	Основные работы
Машко Сергей Владимирович	РФ	Закрытое Акционерное Общество «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (ЗАО «АГРИ»), директор по науке, заведующий лабораторией	Доктор биологических наук, профессор	1. Complete nucleotide sequences and annotations of ϕ673 and ϕ674, two newly characterised lytic phages of <i>Corynebacterium glutamicum</i> / Y. Yomantas, E. Abalakina, J. Lobanova et al. // <i>Archives of Virology</i>. — 2018 2. Mu-driven transposition of recombinant mini-mu unit dna in the <i>Corynebacterium glutamicum</i> chromosome / N. Gorshkova, J. Lobanova, I. Tokmakova et al. // <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i>. — 2018. — Vol. 102, no. 6. — P. 2867–2884. 3. Specific features of l-histidine production by <i>Escherichia coli</i> concerned with feedback control of aicar formation and inorganic phosphate/metal transport / E. Malykh, I. Butov, A. Ravcheeva et al. // <i>Microbial Cell Factories</i>. — 2018. — Vol. 17, no. 42. 4. Complete nucleotide sequence and annotation of the temperate corynephage phi-16 genome / J. Lobanova, E. Gak, I. Andreeva et al. // <i>Archives of Virology</i>. — 2017. — Vol. 162. — P. 2489–2492. 5. Golubeva L., Shupletsov M., Mashko S. Metabolic flux analysis using ^{13}C isotopes. 1. experimental basis of the method and the present state of investigations // <i>Applied Biochemistry and Microbiology</i>. — 2017. — Vol. 53, no. 7. — P. 733–753. 6. Golubeva L., Shupletsov M., Mashko S. Metabolic flux analysis using ^{13}C isotopes. 3. significance for systems biology and metabolic engineering // <i>Applied Biochemistry and Microbiology</i>. — 2017. — Vol. 53, no. 9. — P. 827–841.

				7. Metabolic engineering of Escherichia coli for l-tryptophan production / V. Panichkin, V. Livshits, I. Biryukova, S. Mashko // <i>Applied Biochemistry and Microbiology</i>. — 2016. — Vol. 22, no. 9. — P. 783–809. 8. Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of phenylalanine and related compounds / V. G. Doroshenko, V. A. Livshits, L. G. Airich et al. // <i>Applied Biochemistry and Microbiology</i>. — 2015. — Vol. 51, no. 7. — P. 733–750. 9. Krylov A. A., Kolontaevsky E. E., Mashko S. V. Oligonucleotide recombination in corynebacteria without the expression of exogenous recombinases // <i>Journal of Microbiological Methods</i>. — 2014. — Vol. 105. — P. 109–115. 10. Openflux2: 13 c-mfa modeling software package adjusted for the comprehensive analysis of single and parallel labeling experiments / M. S. Shupletsov, L. I. Golubeva, S. S. Rubina et al. // <i>Microbial Cell Factories</i>. — 2014. — Vol. 13, no. 1:152. — P. 1–25. Background 11. Голубева Л. И., Шуплецов М. С., Машко С. В. Анализ метаболических потоков с использованием 13 С изотопов (13 c-mfa): Iii. Значение для системной биологии и метаболической инженерии // <i>Биотехнология</i>. — 2017. — Т. 33, № 2. — С. 9–28. 12. Голубева Л. И., Шуплецов М. С., Машко С. В. Анализ метаболических потоков с использованием 13 С изотопов (13 c-mfa): I. Экспериментальные основы метода и состояние исследований // <i>Биотехнология</i>. — 2016. — Т. 32, № 5. — С. 10–37. 13. Шуплецов М. С., Голубева Л. И., Машко С. В. Анализ метаболических потоков с использованием 13С-изотопов (13c-mfa). ii. Математические основы метода // <i>Биотехнология</i>. — 2016. — Т. 32, № 6. — С. 9–34. 14. Метаболическая инженерия Escherichia coli для продукции l-триптофана / В. Б. Паничкин, В. А. Лившиц, И. В. Бирюкова, С. В. Машко // <i>Биотехнология</i>. — 2016. — № 2. — С. 11–42. 15. Метаболическая инженерия Escherichia coli для продукции фенилаланина и
--	--	--	--	---

				родственных соединений / В. Г. Дорошенко, В. А. Лившиц, Л. Г. Айрих и др. // Биотехнология. — 2014. — № 4. — С. 8–27.
--	--	--	--	--

Директор по науке ЗАО «АГРИ»
117545 Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1, к.1
Тел. +7(495)780-32-66
e-mail: sergey_mashko@agri.ru
доктор биологических наук, профессор

Подпись Машко С.В. удостоверяю
Зам. генерального директора ЗАО «АГРИ»
кандидат биологических наук