

О Т З Ы В

официального оппонента, кандидата биологических наук Генинга Леонида Владимировича на диссертационную работу Н.В.Горшковой «Разработка эффективных методов интеграции рекомбинантной днк в хромосому метилотрофных бактерий и коринебактерий на основе системы транспозиции фага Mu», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Диссертационная работа Горшковой Натальи Васильевны посвящена разработке нового способа интеграции рекомбинантной ДНК с последующей ее амплификацией в геноме промышленно значимой бактерии *C. glutamicum* с использованием механизма репликативной транспозиции фага Mu, а в сочетании с Cre-зависимым удалением из хромосомы фрагментов ДНК, способствующих проведению и отбору транспозиции, 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 экспрессионных кассет в хромосому отменяет необходимость использования антибиотиков и плазмид для поддержания высокой экспрессии рекомбинантных белков.

С целью интеграции определенных фрагментов ДНК в хромосому *C. glutamicum* были разработаны различные подходы, позволяющие осуществить встраивание рекомбинантной ДНК как в целевые, так и в случайные места на хромосоме с использованием разных механизмов. Однако эти процедуры очень часто требуют много временных и трудо-

вых затрат, особенно при последовательной интеграции нескольких копий генов в хромосому.

В этой связи перспективным явилось использование для интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому бактерий множественной транспозиции бактериофага Mu.

Тем самым актуальность, новизна и научная значимость диссертационной работы Н. В. Горшковой не вызывает никаких сомнений. В то же время работа имеет и существенное практическое значение, поскольку результаты диссертационной работы, а именно, разработанные элементы генетического инструментария могут быть использованы и уже использовались в текущей работе в НИИ «Аджиномото-Генетика» для получения продуцентов некоторых биологически активных веществ.

Диссертация Н. В. Горшковой изложена на 134 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 (226 источников).

Во «Введении» в строгом соответствии с требованиями ВАК показана актуальность, новизна и практическая значимость диссертационной работы.

Тематика «Обзора литературы» соответствует направлению экспериментальных разработок диссертации. «Обзор литературы» состоит из двух крупных разделов: в первом дана общая характеристика бактерии *C. glutamicum*, изложены литературные данные, касающиеся изучения основных путей метаболизма; описаны экономические перспективы индустриальной биотехнологии этого микроорганизма. Детально и вдумчиво рассмотрены работы, освещающие разработку генетических методов и инструментов для метаболической инженерии *C. glutamicum*. Вторая часть обзора посвящена подробному описанию современных представлений о молекулярных механизмах транспозиции бактериофага Mu, а также использованию производных фага – mini-Mu элементов – в качестве инструмента для генной инженерии.

Основной части работы предпослан обзор литературы, который предваряет саму работу и полностью вводит читателя в курс дела. По мнению оппонента «Обзор литературы» написан очень строгим и четким с научной точки зрения, и в то же время литературным языком, содержит подробные и дополняющие текстовое содержание иллюстрации. В целом, обзор характеризует автора как высококвалифицированного специалиста в области генетики и молекулярной биологии.

Раздел «Материалы и методы» также не встречает серьезных замечаний и свидетельствует о высоком профессионализме автора и способности Н. И. Горшковой использовать наряду с классическими методами арсенал современных методов молекулярной

биологии, если это необходимо для получения адекватных результатов и подтверждения теоретических предположений.

Фактически основные результаты, полученные автором, сводятся к следующему. Система интеграции рекомбинантных фрагментов ДНК на основе транспозиции бактериофага Mu сконструирована и успешно использована в клетках *C. glutamicum*. Пр продемонстрирована возможность множественной модификации хромосомы с использованием данной системы. Автором установлено, что интеграция mini-Mu в геном *C. glutamicum* в основном происходит по механизму репликативной транспозиции, что позволяет амплифицировать интегрированные фрагменты ДНК в бактериальной хромосоме. Исследовано влияние энхансерного элемента фага на Mu-зависимую транспозицию в клетках *C. glutamicum* и показано, что введение в состав mini-Mu транспозона энхансерного элемента (E) значительно увеличивает частоту (на два порядка) и множественность амплификации mini-Mu в бактериальном геноме в присутствии факторов транспозиции. Основываясь на установленной зависимости внутримолекулярной транспозиции mini-Mu(LER) от наличия и ориентации энхансера E относительно MuL/R-концов mini-Mu элемента, удалось фиксировать ДНК элементы в интегрированных точках хромосомы, используя Cre-зависимое удаление E из состава mini-Mu перед последующими актами интеграции/амплификации нового mini-Mu(LER) элемента. На взгляд оппонента использованный в данной работе подход представляет значительный научный и практический интерес и может быть рекомендован в качестве полезного инструмента для редактирования *C. glutamicum* хромосомы. Возможности разработанной системы продемонстрированы на примере созданных штаммов *C. glutamicum*, содержащих различное количество копий mini-Mu элементов с генами, кодирующими желтый и зеленый флуоресцентные белки, уECitrine и уEGFP, соответственно. Для более широкого использования системы Mu-зависимой транспозиции в качестве полезного инструмента в целях конструирования бесплазмидных рекомбинантных штаммов с заданными свойствами была продемонстрирована возможность разработанной стратегии и для грамотрицательной бактерии *Methylophilus methylotrophus* AS-1.

Диссертационная работа написана понятным литературным языком, хорошо структурирована, снабжена аккуратными рисунками и понятными таблицами. Тем не менее, следует отметить, что для лучшей наглядности в раздел 2.3 следовало бы внести таблицу, содержащую итоговые значения рассчитанных в работе эффективностей внутривнутрихромосомальной амплификации для mini-Mu единиц разного состава. Также работа не лишена стилистических неточностей и опечаток. В качестве примера можно привести стр 18, на которой размерность генома *C. glutamicum* указана в kb вместо Mb.

Тем не менее, все вышесказанное о полученных автором результатах, 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 Н.В. Горшковой и ее публикации полностью и адекватно отражают содержание диссертации.

А 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 Н.В. Горшковой, несомненно, соответствует требованиям пп. 9-14 (Постановление Правительства РФ №842 «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 года), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология, а ее автор, Н.В. Горшкова, заслуживает присуждения искомой степени.

Официальный оппонент,

старший научный сотрудник лаборатории репликации и репарации генома
Института молекулярной генетики

Российской академии наук

адрес: 123182, Москва,

площадь академика И.В. Курчатова, д. 2

Тел.: +7-499-196-00-11

e-mail: geni@img.ras.ru

кандидат биологических наук

Генинг Леонид Владимирович

27.11.18

Подпись к.б.н. Л. В. Генин

Ученый секретарь

Института молекулярной генетики

Кандидат биологических наук

Андреева Л. Е.

СВЕДЕНИЯ ОБ ОФИЦИАЛЬНОМ ОППОНЕНТЕ ПО ДИССЕРТАЦИИ
Горшковой Натальи Васильевны на тему «РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ ИНТЕГРАЦИИ
 РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК В ХРОМОСОМУ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ И КОРИНЕБАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ
 СИСТЕМЫ ТРАНСПОЗИЦИИ ФАГА М_У»,
 по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Фамилия, Имя, Отчество	Гражданст во	Место основной работы, должность	Ученая степень, звание	Специальность, по которой была защита диссертация	Основные работы по профилю оппонируемой диссертации за 3-5 лет
2	3	4	5	6	7
Генинг Леонид Владимирович	РФ	ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН, старший научный сотрудник лаборатории репликации и репарации генома	кандидат биологических наук	03.01.03 - Молекулярная биология	1. Макарова А.В., Grabow C., Gening L.V., Tarantul V.Z., Tahirov T.H., Bessho T., Pavlov Y.I. Inactivate DNA synthesis in cell extracts of yeast producing active human DNA polymerase ι. PLoS One. 2011, 6(1):e16612. 2. Генинг Л.В. ДНК-полимераза ιота млекопитающих среди участников синтеза ДНК через повреждение. Биохимия 2011, 76, 76-85. 3. Макарова Л.В., Kazakov AA, Макарова AV, Khaidatova NV, Kozikova LV, Nenasheva VV, Gening LV, Tarantul VZ, Andreeva LE. Transient expression and activity of human DNA polymerase ιota in loach embryos. Biotechnol Lett. 2012, 34(2): 205-212. 4. Lakhin A.V., Kazakov A.A., Макарова A.V, Pavlov Y.I., Efremova A.S., Shram S.I., Tarantul V.Z., Gening L.V. Isolation and characterization of high affinity aptamer against DNA polymerase ιota. Nucleic Acid Therapeutics 2012, 22, 49-57. 5. Лахин А.В., Ефремова А.С., Макарова И.В., Гришина Е.Е., Шрам С.И., Тарантул В.З., Генинг Л.В. Влияние Мп (II) на

				ошибочную активность ДНК-полимеразы йота в экстрактах нормальных и опухолевых клеток человека. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2013, №1, 14-20. 6. Генинг Л.В., Лахин А.В., Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., Тарантул В.З. Ингибирование Mn^{2+}-индуцированного некорректного синтеза ДНК с помощью Cd^{2+} и Zn^{2+}. Биохимия 2013, том 78, вып. 10, с. 1452 – 1462. 2013, №1, 14-20. 7. Лахин А.В., Тарантул, В.З., Генинг Л.В. Адаптеры: проблемы, пути их решения и перспективы. АстаNature. 2013,5(4):34-43. 8. Лахин А.В., Тарантул В. З., Генинг Л.В. Индуцированный марганцем некорректный синтез ДНК как возможная причина мантинизма. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2014, №1, 15-21. 9. Gening L.V., Lakhin A.V., Макагова I.V., Nenashcheva V.V., Andreeva I.E., Tarantul V.Z. Alterations in synthesis and repair of dna during the development of loach <i>Misgurnus fossilis</i>. J. Develor. Biol., 2016, 4, doi:10.3390/jdb4010006. 10. Захарчева К.А., Генинг Л.В., Казаченко К.Ю., Тарантул В.З. Клетки, устойчивые к токсическим концентрациям ионов марганца, обладают повышенной способностью к репарации ДНК. Биохимия, 2017, 82,1, с.101-110. 11. Kazachenko K.Y., Miropol'skaya N. A. I., Gening L.V. Tarantul V. Z. .Makagova, A. V. Alternative splicing at exon 2 results in the loss of the catalytic activity of mouse DNA polymerase <i>iota</i> in vitro DNA Repair 50 (2017)
--	--	--	--	---

					77-82.
--	--	--	--	--	--------

Согласен на обработку персональных данных

старший научный сотрудник
лаборатории репликации и репарации генома
ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН
Адрес: Москва, 123182,
площадь академика И.В. Курчатова, д. 2
img@img.gas.ru
Тел.: +7-499-196-00-11
e-mail: geni@img.gas.ru
кандидат биологических наук

подпись Генинга Л.В. заверяю

ученый секретарь ИМГ РАН,
кандидат биологических наук

Генинг Леонид Владимирович

Андреева Л.Е.