

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Натальи Васильевны 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».

Получение высокоэффективных бактериальных штаммов продуцентов низкомолекулярных химических соединений биогенного происхождения является одной из важнейших задач современной биотехнологии. При этом наиболее популярными продуцентами в последнее время становятся безплазмидные и безмаркерные бактериальные штаммы, у которых экспрессирующиеся целевые гены интегрированы в хромосому бактерии-хозяина. В этой связи создание новых систем редактирования бактериального генома путем эффективной доставки целевых генов в бактериальные хромосомы, чему и посвящена диссертационная работа Н.В. Горшковой, несомненно является высокоактуальной задачей. Актуальность и практическая значимость рецензируемой работы многократно усиливается благодаря удачному выбору диссертантом объектов исследования – представителей коринебактерий и метилотрофных микроорганизмов, активно используемых биотехнологами для крупнотоннажного производства аминокислот и других важных метаболитов.

Диссертация Н.В. Горшковой изложена на 134 страницах компьютерного текста, построена по обычному плану – т.е. состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Resultados и обсуждения, а также Выводов, содержит 5 таблиц и 31 рисунок. Список цитированных источников содержит 226 ссылок, из которых пять на русском языке.

Во введении автор определяет проблематику исследования, четко формулирует поставленные цели и задачи работы, подчеркивает ее новизну и практическую значимость, достоверность полученных результатов, а также приводит положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы, как и вся диссертация, написан хорошим литературным языком, является ее неотъемлемой частью и состоит из двух разделов. В первой части обзора автор дает общую характеристику генетическим и молекулярно-биологическим особенностям микроорганизма *Corynebacterium glutamicum* – одного из основных объектов исследования – приводит примеры современных системных подходов направленного

изменения метаболизма клетки с целью превращения субстратов в желаемые продукты ее жизнедеятельности. Основное внимание в обзоре уделено существующим на сегодняшний день генетическим методам, используемым для метаболической инженерии бактерии *Corynebacterium glutamicum*. Вторая часть обзора посвящена молекулярной биологии фага Mu и обнаруживает глубокие знания автора в этой области. В ней критически рассматривается генетический инструментарий, используемый в метаболической инженерии *E.coli*, в том числе, при конструировании безплазмидных безмаркерных промышленных штаммов-продуцентов аминокислот.

В главе «Материалы и методы» содержится исчерпывающее описание использованных в работе микробиологических, биохимических и молекулярно-генетических методов. Содержание раздела свидетельствует о высоком методическом уровне работы. Все методики подробно описаны и могут быть воспроизведены.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из пяти разделов, которые построены логично и позволяют оценить уровень и глубину проведенных диссертантом исследований. Раздел 1 (стр. 75-89) представляет теоретический интерес и посвящен адаптации системы транспозиции бактериофага Mu для интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому *C. glutamicum* ATCC 13869, а именно, детально описан состав входящих в эту систему плазмид, приведены частоты и проанализированы фенотипы клонов, полученных в результате транспозиции mini-Mu(LER) единицы с интегративной плазмиды в хромосому бактерии, выявлены механизмы транспозиции и исследована зависимость эффективности транспозиции от формы донорной плазмидной ДНК и присутствия в ней энхансера.

При выполнении экспериментов, описанных в разделе 2 (стр. 90-99), продемонстрирована возможность внутривнутрихромосомной репликативной транспозиции рекомбинантной mini-Mu(LER)-последовательности, предварительно интегрированной в хромосому *C. glutamicum* ATCC13869, подобраны оптимальные условия осуществления этого процесса. Показано, что наличие энхансера в составе mini-Mu(LER) единицы повышает эффективность ее амплификации, в то время как его полное отсутствие значительно снижает вероятность этого процесса.

Наиболее значимым разделом главы «Результаты и обсуждение» с точки зрения практического применения является раздел 3 (стр. 100-101), в котором, основываясь на выявленной зависимости эффективности процесса внутримолекулярной репликативной транспозиции от присутствия энхансера в составе mini-Mu единицы, была разработана и успешно продемонстрирована стратегия фиксации интегрированных и амплифицированных в хромосоме бактерии *C. glutamicum* ATCC13869 mini-Mu(LER) элементов в результате Cre-зависимого вырезания их энхансер-содержащих ДНК

фрагментов из генома бактерии *in vivo* с преобразованием их в mini-Mu(LR) элементы, неспособные к дальнейшей амплификации в используемых экспериментальных условиях. Это открывало возможность введения в бактериальный геном дополнительных целевых генов без изменения статуса рекомбинантных генов, предварительно интегрированных в геном с помощью разработанного Mu-зависимого механизма. Такая возможность была успешно продемонстрирована путем конструирования штаммов *C. glutamicum* ATCC13869, содержащих различное количество копий mini-Mu элементов в хромосоме с последовательно вводимыми генами *yECitrine* и *yEGFP* желтого и зеленого флуоресцентных белков, соответственно.

Раздел 4 содержит экспериментальные данные, подтверждающие возможность использования разработанной системы для двух других, востребованных промышленной биотехнологией, штаммов *C. glutamicum* ATCC 13032 и его производного MB001, что демонстрировало универсальный характер разработанной системы. После анализа и обобщения результатов, полученных для всех трех штаммов *C. glutamicum*, диссертантом был разработан более удобный новый интегративный вектор, что является еще одним практическим достижением данной работы.

Заключительный раздел 5 посвящен двум грамотрицательным метилотрофным бактериям, *Methylophilus methylotrophus* AS1 и *Methylobacterium extorquens* AM1 – перспективным объектам многочисленных биотехнологических приложений.

Установлено, что разработанная в Разделе 3 стратегия конструирования безплазмидных рекомбинантных штаммов с амплифицированными в хромосоме копиями целевых генов также может быть применена и для этих организмов, что значительно расширяет границы практического приложения системы репликативной транспозиции фага Mu.

Достижение цели любого экспериментального исследования может быть осуществлено разными путями. В данном случае нет смысла критиковать использованные автором методы и подходы, которые несомненно привели к желаемому результату. Тем не менее, в качестве пожелания на будущее хотелось бы отметить, что эффективность использования Н.В. Горшковой флуоресцентных белков для количественной оценки копийности интегрированных в хромосому рекомбинантных последовательностей можно было бы, на мой взгляд, существенно улучшить с помощью проточной цитофлуориметрии. Этот метод позволил бы отбирать бактериальные клетки, содержащие хромосомные многокопийные вставки, значительно точнее, чем использованные автором маркеры устойчивости к антибиотикам.

Подводя итог всему сказанному можно заключить, что к защите представлена высококвалифицированная работа, выполненная на самом современном уровне. Автор успешно достиг поставленной цели – адаптации известной μ -зависимой системы транспозиции к редактированию генома новых видов промышленных микроорганизмов и позиционировал себя как высококвалифицированного исследователя несомненно кандидатского уровня.

Автореферат диссертации Горшковой Н.В., изложенный на 27 страницах, удовлетворяет требованиям ВАК России и в полной мере отражает наиболее существенные положения и выводы, вынесенные на защиту. Ключевые результаты диссертационной работы Н.В. Горшковой отражены в четырех опубликованных печатных работах, включая 3 статьи в международных рецензируемых журналах с высоким импакт-фактором. Результаты работы были представлены на Международном симпозиуме. Получен 1 патент.

С учетом всего вышеизложенного считаю, что по критериям актуальности, научной новизны и практической значимости представленная к защите диссертация «Разработка эффективных методов интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому метилотрофных бактерий и коринебактерий на основе системы транспозиции фага μ » полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 (Постановление Правительства РФ №842 «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 года), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Горшкова Наталья Васильевна безусловно заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 «Молекулярная биология».

28 ноября 2018 г.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии
ФГБУН Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии Наук
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
Телефон: 8(499)793-46-11,
E-mail: patrush@mch.ru
д.б.н., профессор

Подпись Л.И. Патрушева заверяю

Ученый секретарь ИБХ РАН, доц

Патрушев Лев Иванович

Владимир Александрович

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

Фамилия, Имя, Отчество	Гражданст во	Место основной работы, должность	Ученая степень, звание	Специальность, по которой была защищена диссертация	Основные работы по профилю оппонируемой диссертации за 3-5 лет
2	3	4	5	6	7
Патрушев Лев Иванович	РФ	ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии	д.б.н., профессор	03.01.03 - Молекулярная биология	1. Коваленко Т.Ф., Патрушев Л.И. 2018. Псевдогены как функционально значимые элементы генома. Биохимия, 2018, том 83, вып. 11, с. 1643 – 1662 2. Коваленко Т.Ф., Морозова К.В., Озолина Л.А., Лапина И.А., Патрушев Л.И. Псевдоген RTENP1, в отличие от гена RTEN, метилирован у женщин среднего и пожилого возраста в нормальных, гиперпластических и малигнизированных тканях эндометрия. Acta Naturae, 2018, 10, №1(36), 46-54. 3. Беленков Ю.Н., Голубь А.В., Попова Л.В., Шелест Е.А., Патрушев Л.И. , Кондратьева Т.Б., Аксенова М.Б., Хлевчук Т.В. Влияние тромбофилий и повышенного индекса массы тела на риск развития венозных тромбозов. Клиническая медицина. 2017. Т. 95. № 6. С. 545-548 4. 16. Лапина И.А., Озолина Л.А., Доброхотова Ю.Э., Насырова Н.И., Патрушев Л.И. , Гаврилов М.В.

					Лечение эндометриоза: фармакологические аспекты противоспаечной активности. Consilium Medicum. 2016. Т. 18. № 6. С. 77-81. 5. Жданова Л.В., Бимбаев А.Б.Ж., Гатыпова Р.Б., Патрушев Л.И. Внутрисердечный тромбоз у ребенка с наследственной тромбофилией. Кардиология. 2016. Т. 56. № 1. С. 101-102. 6. Patrushev L.I., Kovalenko T.F. Functions of noncoding sequences in mammalian genomes. Biochemistry (Moscow). 2014. Т. 79. № 13. С. 1442-1469. 7. Варданян А.В., Баданян А.Л., Мумладзе Р.Б., Патрушев Л.И., Долидзе Д.Д. Использование ДНК-диагностики в лечебной тактике ведения больных с тромбозом глубоких вен. Анналы хирургии. 2014. № 3. С. 12-19. 8. Айсина Р.Б., Мухаметова Л.И., Острякова Е.В., Середавкина Н.В., Патрушев Л.И., Патрушева Н.Л., Решетняк Т.М., Гулин Д.А., Гершкович К.Б., Насонов Е.Л., Варфоломеев С.Д. Полиморфизм гена ингибитора активатора плазминогена типа 1, уровень плазминогена и тромбозы у пациентов с антифосфолипидным синдромом. Биомедицинская химия. 2014. Т. 60. № 1. С. 72-93. 9. Aisina R.B., Mukhametova L.I., Varfolomeyev S.D., Ostryakova E.V., Seredavkina N.V., Reshetnyak T.M., Nasonov E.L., Patrushev L.I., Patrusheva N.I., Gulina D.A.,
--	--	--	--	--	--

					Gershkovich K.B. Polymorphism of the plasminogen activator inhibitor type 1 gene, plasminogen level and thromboses in patients with the antiphospholipid syndrome. Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B: Biomedical Chemistry. 2013. T. 7. № 1. C. 1-15. 10. Коваленко Т.Ф., Сорокина А.В., Озолина Л.А., Патрушев Л.И. Метилирование 5'-концевой области псевдогена РТЕНР1 при раке и гиперплазиях эндометрия. Биоорганическая химия. 2013. Т. 39. № 4. С. 445--453.
--	--	--	--	--	---

Согласен на обработку персональных данных

ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии
 ФГБУН Институт биоорганической химии
 им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН
 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10
 Тел.: +7 (499) 793-46-11
 e-mail: patrush@ibch.ru
 доктор биологических наук, профессор, Патрушев Лев Иванович

Подпись

подпись Патрушева Л.И. заверяю
 ученый секретарь ИБХ РАН, доктор физ.-мат. наук, Олейников Владимир Александрович

Подпись

