

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук
(ИОГен РАН)

ул. Губкина, д. 3, г. Москва, ГСП-1, 119991
Тел.: (499) 135-62-13, (499) 135-20-41
Факс: (499) 132-89-62

E-mail: iogen@vigg.ru
[http: www.vigg.ru](http://www.vigg.ru)

29.11.2018 № 92 - 01-25 / 415

На № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

директор ФГБУН

«Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН»

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической

Горшковой Натальи Васильевны

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

1. Актуальность темы выполненной работы

Работа Горшковой Н. В. посвящена разработке генетического инструментария, позволяющего быстро и эффективно осуществлять множественную модификацию генома грамположительной бактерии *Corynebacterium glutamicum* и некоторых мезофильных бактерий.

Актуальность тематики работы касается, в первую очередь, объекта исследования.

Вид *Corynebacterium glutamicum* является хорошо изученной почвенной бактерией и представляет большое значение в области биотехнологии в качестве промышленного продуцента основной массы L-аминокислот (глутамата, лизина и триптофана) для пищевой и кормовой промышленности и других биологически активных соединений. В промышленном производстве существует постоянная необходимость в штаммах с улучшенными продуцирующими свойствами. Однако метаболизм клетки, представляющий собой сложную систему весьма взаимосвязанных метаболических реакций, подвержен строгой и четкой регуляции. Для использования штамма микроорганизма в качестве промышленного продуцента эта регуляция должна быть изменена таким образом, чтобы направить биосинтетический аппарат клетки по пути получения максимального количества необходимого метаболита, т. е. создания непрерывного синтеза.

Использование новейших достижений фундаментальных отраслей биологии наряду с применением современных Х-омных технологий способствовало формированию целостного представления о метаболизме *C. glutamicum*, что позволило эффективно и продуктивно генерировать идеи и концепции целенаправленного изменения метаболизма бактерии с целью конструирования высокопродуктивных производственных штаммов.

Появление технологии генетического конструирования *in vitro*, основанной на введении индивидуальных фрагментов ДНК в живую клетку с получением рекомбинантных генетических структур с заданными свойствами, позволило осуществить метаболический дизайн штаммов с целью улучшения их показателей продуктивности.

Часто в процессе конструирования высокопродуктивных штаммов встает задача увеличения активности генов пути биосинтеза целевого продукта, одним из простейших решений которой может быть введение дополнительных копий гена в клетку бактерии в составе плазмиды высокой или средней копийности или путем интеграции необходимого количества копий гена непосредственно в геном бактерии. Последний способ является более предпочтительным в настоящее время в связи с существующим запретом на использование плазмид при создании промышленных штаммов. В связи с этим задача совершенствования существующих и разработки новых генно-инженерных техник для интеграции рекомбинантной ДНК в геном *C. glutamicum* не утратила своей актуальности и сегодня.

2. Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

Научную новизну диссертационной работы определяют следующие результаты исследования, впервые полученные соискателем:

Ранее разработанная для грамотрицательных бактерий двухплазмидная система Mu-зависимой транспозиции целевых фрагментов ДНК в бактериальный геном, содержащая mini-Mu(LR) единицу в качестве первого компонента и совместимую с ней хелперную плазмиду с генами, кодирующими факторы транспозиции MuA, MuB, в качестве второго компонента, была модифицирована и впервые адаптирована для интеграции и последующей амплификации рекомбинантной ДНК в составе mini-Mu элементов в хромосому нескольких штаммов *Corynebacterium glutamicum in vivo*. Показано, что основным механизмом транспозиции с интегративной плазмиды в хромосому бактерии является репликативная транспозиция, идущая через образование структуры коинтеграта с последующим его возможным ResA-зависимым разрешением. Обнаружено, что присутствие энхансера (E) в составе mini-Mu элемента в природной ориентации по отношению к Mu-концам значительно повышает эффективность репликативной транспозиции в условиях экспрессии белковых факторов MuA, MuB в клетках коринебактерий, особенно при амплификации в хромосоме, имеющей сниженную плотность суперспирализации вследствие взаимодействия с клеточными белками. Поэтому, проведя необходимую модификацию системы, была разработана новая стратегия редактирования генома *C. glutamicum*, позволяющая осуществить фиксацию необходимого количества копий целевого гена. После интеграции/амплификации первой mini-Mu(LR) единицы в хромосому *C. glutamicum*, E-элемент, фланкированный мутантными *lox66-lox71* сайтами, вырезается, используя Cre рекомбиназу фага P1, тем самым фиксируя положение укороченных mini-Mu (LR) единиц, что позволяет осуществить последующую интеграцию/амплификацию новых mini-Mu(LR) единиц. Эта стратегия была продемонстрирована с использованием генов, кодирующих желтый и зеленый флуоресцентные белки, уECitrine и уEGFP, соответственно.

3. Значимость для науки и производства (практики) полученных автором диссертации результатов

Теоретическая значимость диссертационной работы Горшковой Н.В. заключается в демонстрации функционирования системы транспозиции фага Mu в клетках грамположительной бактерии *C. glutamicum in vivo* и выявлении механизма этого процесса на разных этапах транспозиции. Важным также являются экспериментальные данные о необходимости наличия *cis* действующего энхансера в составе mini-Mu транспозона для осуществления эффективной транспозиции в геноме грамположительных бактерий, что согласуется с ранее полученными экспериментальными данными для грамотрицательных бактерий *E. coli* и *Methylophilus methylotrophus* AS-1.

Применение данных подходов позволило использовать систему транспозиции фага Mu для осуществления редактирования генома через интеграцию необходимых фрагментов ДНК с

последующей их амплификацией в хромосоме бактерии *C. glutamicum*. Разработанная система представляет собой удобный генетический инструмент, прикладным значением которого является конструирование бесплазмидных безмаркерных штаммов-продуцентов биологически активных веществ. Конструирование штаммов-продуцентов некоторых аминокислот на базе грамположительной *C. glutamicum* в НИИ «Аджиномото-Генетика» подтверждает достоверность полученных результатов.

На основании вышеизложенного можно заключить, что научно-практическая значимость рукописи не вызывает сомнения.

4. Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Предлагаемая в диссертационной работе Горшковой Н.В. стратегия может быть использована для получения продуцентов биологически активных веществ на базе *C. glutamicum* и метилотрофных бактерий с заданными свойствами и высокой эффективностью продукции в текущей работе в НИИ «Аджиномото-Генетика», а также для проведения фундаментальных исследований.

5. Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Для достижения цели исследования были поставлены адекватные задачи, которые удалось полностью решить с использованием широкого набора современных и классических микробиологических и молекулярно-генетических методов исследования, а также с использованием баз данных GenBank.

Применение этих методов позволило автору получить новые данные о механизмах транспозиции фага Mu в грамположительной бактерии *C. glutamicum* и исследовать зависимость эффективности процесса транспозиции от наличия и ориентации ДНК элемента фага - энхансера и уровня экспрессии генов, кодирующих факторы транспозиции фага MuA и MuB.

Предложена новая стратегия, позволяющая быстро и эффективно осуществлять интеграцию целевых фрагментов гетерологичной ДНК с последующей их амплификацией до необходимого уровня в хромосому бактерии с получением на конечном этапе стабильных рекомбинантных штаммов с заданными свойствами.

Оценивая в целом объем представленных результатов, качество их анализа и тщательность обсуждения, следует подчеркнуть строгую обоснованность всех научных положений, выдвинутых к защите, и абсолютную корректность сформулированных по результатам диссертационной работы выводов.

6. Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению

Диссертационная работа Н.В. Горшковой представляет собой труд в 134 страницы текста с иллюстрациями, написанный по классическому принципу; состоит из Введения, Обзора литературы, Экспериментальной части (включающей описание Материалов и Методов, изложение и обсуждение результатов исследования), Выводов, Списка сокращений и условных обозначений, Списка цитируемой литературы, Благодарности.

Во Введении достаточно полно определена проблематика исследования и четко сформулированы цель и задача диссертационной работы.

Обзор литературы, представленный в работе, достаточно полно освещает вопросы, касающиеся темы исследования. В обзоре дана морфологическая и биохимическая характеристика вида грамположительной бактерии *C. glutamicum*, рассмотрены современные методы исследования *C. glutamicum* - промышленного продуцента основной массы аминокислот, а также перспективы его дальнейшего использования в промышленном производстве. Приведен краткий обзор существующих на сегодняшний день основных генно-инженерных подходов и инструментария для редактирования генома этой бактерии. Этот раздел наиболее интересен для оппонента и необходим для введения читателя в проблематику работы. Вторая часть обзора посвящена характеристике фага Mu. Подробно дано описание строения и функций ДНК элементов фага и белков, принимающих участие в транспозиции, разобраны подробно стадии репликативной и нерепликативной транспозиции фага. В последнем подразделе Обзора литературы приведены примеры генетических инструментов, разработанных на базе фага Mu.

В главе Материалы и методы исследования методики описаны достаточно подробно, что позволяет воспроизвести их. Применяемые методы адекватны поставленным задачам исследования. Работа проведена на современном методическом уровне с использованием различных методов генетической инженерии, биохимии и молекулярной генетики.

Глава Результаты и обсуждение состоит из 5 разделов, в которых последовательно изложены результаты, полученные на каждом этапе работы.

Приведенные в работе научные положения, выводы аргументированы, основаны на фундаментальных научных положениях, общепринятых теоретических закономерностях, опираются на экспериментальные данные и являются их логическим следствием. В работе нет взаимно противоречивых выводов.

В целом диссертация Горшковой Н.В. является законченным научным исследованием, выполненным на высоком экспериментальном уровне и отличающимся новизной и актуальностью.

Отмечая достоинства диссертационной работы, ее практическую значимость и научную новизну, следует указать на некоторые недостатки:

1. Основное замечание относится к изложению материала в разделе Обзор литературы - автор подробно останавливается на описании метаболизма бактерии *C. glutamicum*, а также современных методов исследования бактерии, что напрямую не связано с содержанием диссертационной работы.

2. В работе присутствуют опечатки и редакционные погрешности. Так, в таблице 1 на стр. 60, строка 3, пропущен знак $\bar{E}$ в обозначении плазмиды pAH-mini-Mu(L $\bar{E}$ R)-YK.

Однако высказанные замечания являются минорными, не касаются основного результата диссертационной работы, определяющего ее новизну и научную значимость. Поэтому высказанные замечания не снижают общей высокой положительной оценки работы.

7. Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат соответствует экспериментальным данным и содержит основные положения диссертации.

8. Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

Основные положения диссертации нашли отражение в публикациях четырех научных статей, три в зарубежных журналах и одна в отечественном из списка ВАК, а также в одном патенте. Отдельные результаты работы также представлялись на Международном симпозиуме.

9. Заключение по диссертационной работе

Диссертационная работа Н.В.Горшковой «Разработка эффективных методов интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому метилотрофных бактерий и коринебактерий на основе системы транспозиции фага Mu», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 «Молекулярная биология», является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи конструирования бесплазмидных высокопродуктивных штаммов для нужд биотехнологии, и полностью отвечает требованиям ВАК РФ к кандидатским диссертациям (п.9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением правительства Российской Федерации от

24.09.13. №842), а ее автор, Горшкова Наталья Васильевна, без сомнения заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - «Молекулярная биология».

Отзыв рассмотрен и одобрен на семинаре Отдела генетических основ биотехнологии Института общей генетики им. Вавилова РАН, протокол № 120 от 27 ноября 2018 г.

Ведущий научный сотрудник Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт общей генетики
им. Н.И. Вавилова Российской академии наук
доктор биологических наук

Е.У. Полуэктова

Москва, 119991, ул. Губкина, 3, ИОГен РАН
Тел.: +7 (499) 135-12-39
epolu@vigg.ru

Подпись Е.У.Полуэктовой **заверяю**
Ученый секретарь ИОГен РАН,
доктор биологических наук



Сведения о ведущей организации

на диссертацию Горшковой Натальи Васильевны

«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.

Официальное полное наименование Федерального Государственного учреждения:

Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Сокращенное наименование: ИОГен РАН

Почтовый адрес: Москва, 119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, д. 3

Тел.: +7 (499) 135-62-13

Факс: +7 (499) 139-89-62

Email: iogen@vigg.ru

Сайт: <http://www.vigg.ru/>

Директор института: Кудрявцев Александр Михайлович, доктор биологических наук

Список основных публикаций сотрудников ведущей организации в рецензируемых изданиях по теме исследования за последние 5 лет:

1. Nezametdinova V.Z., Zakharevich N.V., Alekseeva M.G., Averina O.V., Mavletova D.A., Danilenko V.N. Identification and characterization of the serine/threonine protein kinases in *Bifidobacterium*/ Archives of Microbiology. (2014) 196:125-136.
2. Bekker O.B., Klimina K. M., Vatlin A.A., Zakharevich N. V., Kasianov A. S., Danilenko V. N.. Draft Genome Sequence of *Streptomyces fradiae* ATCC19609, a strain highly sensitive to antibiotics.// Genome Announcements 2014, V.2, № 6, e01247-14
3. Alekseeva M. G., Mironcheva T. A., Mavletova D. A., Elizarov S. M., Zakharevich N. V., Danilenko V. N. Fo F1 -ATP synthase of *Streptomyces fradiae* ATCC 19609: Structural, biochemical, and functional characterization/ Biochemistry (Moscow), 2015, V.80 (3), pp 296-309.
4. Krügel H., Klimina K., Mrotzek G., Tretyakov A., Schöfl G., Saluz H.-P., Brantl S., Poluektova E., Danilenko V. Expression of the toxin –

- antitoxin genes yefMLrh, yoeBLrh in human *Lactobacillus rhamnosus* isolates // J.Basic Microbiology. 2015.V 54 (8). PP 982-91.
5. Luzina O.A., Sokolov D.N., Pokrovskii M.A., Pokrovskii A.G., Bekker O.B., Danilenko V.N. Synthesis and biological activity of usnic acid enamine derivatives // Chemistry of Natural Compounds 2015, V.51., №4, PP.646-647.
 6. Boyko KM, Gorbacheva MA, Korzhenevskiy DA, Alekseeva MG, Mavletova DA, Zakharevich NV, Elizarov SM, Rudakova NN, Danilenko VN, Popov VO. Structural characterization of the novel aminoglycoside phosphotransferase AphVIII from *Streptomyces rimosus* with enzymatic activity modulated by phosphorylation. / Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC) 2016, 477(4):595-601
 7. Ватлин А.А., Беккер О.Б., Лысенкова А.М., Королев А.М., Щекотихин А.Е., Даниленко В.Н. Секвенирование и анализ резистомы *Streptomyces fradiae* ATCC19609 с целью разработки тест-системы для скрининга новых антибактериальных веществ / Генетика, 2016, Т.52, № 6, стр 723-727
 8. Klimina, K.M., Poluektova, E.U., Danilenko, V.N. Bacterial toxin-antitoxin systems: Properties, functional significance, and possibility of use (Review) / Applied Biochemistry and Microbiology, 2017, Vol. 53, No. 5, pp. 494-505.
 9. Marsova M.V., Abilev S.K., Poluektova E.U., Danilenko V. N. A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of *lactobacillus* strains from human microbiota/ Journal of Microbiology and Biotechnology 2018, 34:27, DOI:10.1007/s11274-018-2410-2
 10. Алексеева М.Г., Мавлетова Д.А., Даниленко В.Н. Тест-система *Escherichia coli*/aphVIII/gsk3β для селективного скрининга ингибиторов серин-треониновой протеинкиназы GSK3β./Генетика, 2018,Т.54, приложение с.S14-S17

Заместитель директора по научной работе
Доктор биологических наук, профессор

