

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 217.013.01,  
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО  
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ  
ПРОМЫШЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НАЦИОНАЛЬНОГО  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ» (НИЦ  
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ» - ГОСНИИГЕНЕТИКА) ПО ДИССЕРТАЦИИ НА  
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

решение диссертационного совета от 18 декабря 2018 г., протокол № 21  
о присуждении Горшковой Натальи Васильевне, гражданке Российской  
Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Разработка эффективных методов интеграции рекомбинантной  
ДНК в хромосому метилотрофных бактерий и коринебактерий на основе системы  
транспозиции фага Mu» по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»  
принята к защите 9 октября 2018 г., протокол №18а диссертационным советом Д  
217.013.01, созданным на базе НИЦ «Курчатowski институт» - ГосНИИГенетика  
(117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1), утвержденного приказом  
Минобрнауки РФ № 105/НК от 11 апреля 2012 г.

Соискатель Горшкова Наталья Васильевна, 1967 года рождения, в 1991 году  
окончила Московский химико-технологический институт им. Д.И.Менделеева  
(МХТИ), ныне Российский химико-технологический университет по направлению  
19.03.01 «Биотехнология», в настоящее время работает младшим научным  
сотрудником в ЗАО «Научно-исследовательский институт «Аджиномото-Генетика».

Диссертационная работа выполнена в лаборатории №3 ЗАО «Научно-  
исследовательский институт «Аджиномото-Генетика».

**Научный руководитель:** Машко Сергей Владимирович – доктор биологических  
наук, профессор, директор по научной работе и заведующий лабораторией № 4 ЗАО  
«Научно-исследовательский институт «Аджиномото-Генетика».

**Официальные оппоненты:**

**Патрушев Лев Иванович** – доктор биологических наук, профессор, ведущий  
научный сотрудник лаборатории биотехнологии Федерального государственного

бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской Академии Наук, г. Москва,

**Генинг Леонид Владимирович** - кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории репликации и репарации генома «Институт молекулярной генетики» Российской академии наук, г. Москва,

дали **положительные** отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация,** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук (ИОГен РАН), г. Москва, в своем положительном отзыве, подписанном доктором биологических наук Полуэктовой Еленой Ульриховной, являющейся ведущим научным сотрудником лаборатории генетики микроорганизмов, указала, что тема диссертации, посвященная разработке генетического инструментария, позволяющего быстро и эффективно осуществлять множественную модификацию генома грамположительной бактерии *Corynebacterium glutamicum* и некоторых метилотрофных бактерий, является неоспоримо востребованной задачей в рамках конструирования высокопродуктивных бесплазмидных безмаркерных штаммов, когда встает задача увеличения активности генов пути биосинтеза целевого продукта.

Однако, отмечая достоинства диссертационной работы и ее практическую значимость, следует отметить некоторые недочеты:

1. В разделе Обзор литературы автор подробно останавливается на описании метаболизма бактерии *Corynebacterium 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, на строке 3 пропущен знак  $\bar{\epsilon}$  в обозначении плазмиды рАН-mini-Mu(L $\bar{\epsilon}$ R)-YK.

Вместе с тем, указанные замечания не снижают ценности диссертационной работы, не влияют на ее главные работы и носят рекомендательный характер. Также отмечено, что по актуальности, научной новизне, фундаментальной и практической значимости диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о

порядке присуждения ученой степени» утвержденного постановлением правительства РФ №842 от 24.09.2013 г. в редакции от 28.08.2017 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Соискатель имеет 4 опубликованные работы, в том числе 4 по теме диссертации, из них в рецензируемых научных изданиях одна работа, в зарубежных журналах, индексируемых в Web of Science – 3, получен один патент РФ.

Список научных работ по теме диссертации:

1. Абалакина Е.Г., Токмакова И.Л., **Горшкова Н.В.**, Смирнов С.В., Ахвердян В.З., Машко С.В., Йомантас Ю.В. Использование системы транспозиции бактериофага Му для интеграции рекомбинантной ДНК в хромосому *Methylophilus methylotrophus* // Биотехнология. – 2008. – №. 3. – С. 13-26.

2. Токмакова И.Л., Абалакина Е.Г., **Горшкова Н.В.**, Йомантас Ю.В. Способ придания бактерии, принадлежащей к роду *Methylophilus*, ауксотрофности по L-аминокислоте. // Патентная заявка РФ №2007111371. – 28.03.2007.

3. Abalakina E.G., Tokmakova I.L., **Gorshkova N.V.**, Gak E.R., Akhverdyan V.Z., Mashko S.V., Yomantas Y.A.V. Phage Mu-driven two-plasmid system for integration of recombinant DNA in the *Methylophilus methylotrophus* genome // Applied microbiology and biotechnology. – 2008. – V. 81. – №. 1. – P. 191-200.

4. Yomantas Y. V., Tokmakova I.L., **Gorshkova N.V.**, Abalakina E.G., Kazakova S.M., Gak E.R., Mashko S.V. Aromatic amino acid auxotrophs constructed by recombinant marker exchange in *Methylophilus methylotrophus* AS1 cells expressing the *aroP*-encoded transporter of *Escherichia coli*. // Applied and environmental microbiology. – 2010. – V. 76. – №. 1. – P. 75-83.

5. **Gorshkova N.V.**, Lobanova J.S., Tokmakova I.L., Smirnov S.V., Akhverdyan V.Z., Krylov A.A., Mashko S.V. Mu-driven transposition of recombinant mini-Mu unit DNA in the *Corynebacterium glutamicum* chromosome // Applied microbiology and biotechnology. – 2018. – V. 102. – №. 6. – P. 2867-2884.

На диссертацию и автореферат поступили **положительные** отзывы:

от д.б.н. Нефедовой Лидии Николаевны, доцента кафедры генетики биологического факультета Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова,

от к.б.н. Бабусенко Елены Сергеевны, доцента кафедры биотехнология факультета биотехнологии и промышленной экологии Российский химико-технологический университет (РХТУ) им. Д.И.Менделеева,

от к.б.н. Кирюхина Михаила Юрьевича, заведующего лабораторией №1 ЗАО «Научно-исследовательский институт «Аджиномото-Генетика»,

от к.б.н. Рябченко Людмилы Евгеньевны, ведущего научного сотрудника лаборатории молекулярной биотехнологии НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика,

Отзывы критических замечаний не содержат, лишь в последнем в качестве замечания отмечается, 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, отмечается наличие графических недочетов в оформлении автореферата.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными интересами и достижениями в области микробиологии и молекулярной биологии микроорганизмов, генной инженерии, позволяющими оценить научную и практическую значимость диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

**Разработан** новый эффективный подход редактирования бактериального генома *Corynebacterium glutamicum*, позволяющий осуществлять интеграцию с последующей амплификацией рекомбинантной ДНК в хромосому бактерии *in vivo*, с использованием системы транспозиции фага Mu *E. coli*.

**Предложена** гипотеза о возможности регулирования множественности процесса внутримолекулярной репликативной транспозиции уровнем экспрессии белков MuA, MuB.

**Разработана** новая стратегия модификация генома *C. glutamicum* и некоторых метилотрофных бактерий, позволяющая осуществить фиксацию необходимого количества копий целевого гена.

**Продемонстрирована** возможность разработанной стратегии на примере конструирования штаммов *C. glutamicum* ATCC13869, содержащих амплифицирован-

ные в хромосоме копии целевых генов *yECitrine* и *yEGFP*, кодирующих желтый и зеленый флуоресцентные белки, соответственно.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

**Изучен** основной механизм транспозиции с интегративной плазмиды в хромосому бактерии *Corynebacterium glutamicum*, представляющий собой репликативную транспозицию.

**Показано**, что для небольшой доли первичных интегрантов был использован репаративный путь транспозиции mini-Mu единицы с интегративной плазмиды в геном бактерии.

**Показано**, что присутствие энхансера в составе mini-Mu элемента в природной ориентации по отношению к Mu-концам значительно повышает эффективность репликативной транспозиции в клетках коринебактерий *in vivo*, особенно при амплификации в хромосоме, имеющей сниженную плотность суперспирализации вследствие взаимодействия с клеточными белками.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

**1. Разработан** новый генетический инструмент для модификации генома грамположительной бактерии *Corynebacterium glutamicum*, прикладным значением которого является конструирование стабильных бесплазмидных безмаркерных штаммов-продуцентов биологически активных веществ.

**2. Представлены** методические рекомендации по проведению процесса транспозиции гетерологичной ДНК в составе mini-Mu элемента с интегративной плазмиды в геномы трех штаммов *Corynebacterium glutamicum in vivo*.

**3. Установлено**, что разработанная стратегия фиксации генетических элементов в хромосоме также может быть применена для двух метилотрофных бактерий - *Methylophilus methylotrophus* AS1 и *Methylobacterium extorquens* AM1, что значительно расширяет границы практического приложения системы репликативной транспозиции фага Mu.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

что научные положения и выводы основаны на экспериментальных результатах, полученных с использованием комплекса современных методов генетической инженерии, молекулярной биологии и биохимии;

для экспериментальных работ показана воспроизводимость результатов, полученных на сертифицированном оборудовании;

теоретические положения и выводы, изложенные в диссертационной работе, базируются на полученных автором экспериментальных результатах и анализе современных литературных данных;

использованы современные методики сбора и обработки исходной информации, что свидетельствует о высоком методическом уровне;

идея базируется на анализе практики использования системы транспозиции фага *Mu* для интеграции рекомбинантной ДНК в геномы грамотрицательных бактерий.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном планировании исследований, выполнении основной экспериментальной работы, обработке, анализе и обсуждении полученных результатов.

На заседании 18 декабря 2018 года диссертационный совет принял решение присудить Горшковой Н.В.. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 11 докторов наук по специальности 03.01.03 –молекулярная биология, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 17, против - нет, недействительный бюллетень – 1.

Председатель диссертационного совета

д.б.н., профессор, академик РАН

Дебабов В.Г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., доцент

Воюшина Т.Л.

Дата составления заключения

21 декабря 2018