

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Бубнова Дмитрия Михайловича на тему: «Инструменты интеграции в геном *Escherichia coli* и других представителей порядка *Enterobacteriales*» по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

Актуальность

Конструирование микроорганизма с заданными свойствами актуально как для исследовательских целей, так и при решении задач биотехнологии по созданию продуцентов биологически активных веществ. *Escherichia coli* является промышленно-значимым микроорганизмом, кроме того, - это представитель *Enterobacteriales*. Энтеробактерии включают в себя различные патогены. Поэтому инструменты генетического модифицирования могут быть использованы при создании бактериальных вакцин.

Диссертационная работа Бубнова Д.М. посвящена усовершенствованию одного из главных инструментов рекомбинационной инженерии *Escherichia coli*, а именно λ Red-системы. Инструментарий, созданный на основе системы рекомбинации Red фага λ К. Даценко в группе Б. Ваннера в 2000 г., быстро распространился по лабораториям всего мира. По причине эффективности и доступности работа, описывающая этот инструментарий (Datsenko and Wanner, 2000), была одной из самых цитируемых в последующие 15 лет. В предложенном методе λ Red-рекомбиназа была скомбинирована с сайт-специфической рекомбиназой FLP из *Saccharomyces cerevisiae*, с помощью которой *in vivo* удалялся ген устойчивости к антибиотику, который маркировал введенную в хромосому модификацию. После удаления маркера в хромосоме оставался FRT-сайт из 27 н.о., так называемый «шрам». Помимо FRT-сайтов, которых могло быть несколько после введения последовательных модификаций, упомянутый выше метод имел ограничение на размер фрагмента ДНК, который

интегрировали в хромосому. Интеграции фрагментов ДНК более 4 т.н.п. практически не отбирались.

Рецензируемая работа посвящена разработке технологии получения «безшрамовых» штаммов, содержащих интеграции фрагментов ДНК более 4 т.н.п. и, действительно, актуальна.

Общая характеристика работы

Работа изложена на 153 стр. (Times New Times New Roman, 14-ый кегль, с полуторным интервалом) по следующему плану: Список сокращений, Введение, Обзор литературы (глава I), Материалы и методы (глава II), Результаты и обсуждение (глава III), Заключение, Выводы, Список цитируемой литературы, Приложения.

В Обзоре литературы (31 стр.), описывается открытие Red-зависимой гомологичной рекомбинации фага λ , её сравнение и взаимодействие с RecABCD системой гомологичной рекомбинации клетки-хозяина *E. coli*. Рассматриваются методы редактирования генома до внедрения в практику λ Red-системы, а так же применение этой системы для редактирования генома *E. coli*. В обзоре литературы, как и во введении, слишком много внимания уделяется истории исследований λ Red-системы и *E. coli*, что отражается в избыточном цитировании литературы 1960х – 1970х гг. В свою очередь, список примеров усовершенствования λ Red-опосредованной инженерии явно сокращён.

Раздел «Материалы и методы» занимает 27 стр. К этому разделу можно отнести также раздел «Приложения» (8 стр.), включающий таблицы олигонуклеотидов, использованных в работе, и штаммов, с описанием их конструирования. Эти разделы демонстрируют большую проделанную работу по конструированию штаммов и плазмид.

В разделе «Результаты и обсуждение» (47 стр.) представлены этапы создания нового инструментария для редактирования генома *E. coli*. Это конструирование новых вспомогательных плазмид для экспрессии генов

λ Red-системы, утрату которых можно индуцировать с помощью изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом. Исследования возможности отбора немаркированных модификаций в хромосоме и отработка системы негативной селекции с использованием hok-токсина. Проведённые эксперименты были хорошо спланированы с использованием легко селективируемых признаков утилизации сахаров. Сделанные выводы, касающиеся эффективности разработанной системы негативной селекции, основаны на проведении расширенного статистического анализа результатов. Безусловной «изюминкой» работы являются исследования, касающиеся применения разработанной системы для интеграции протяжённых фрагментов ДНК. К сожалению авт. не указал размеры фрагментов ДНК, содержащих опероны *scr*, *vio*, *lux*, которые использовались для интеграции. Интересным обнаруженным и доказанным фактом является негативное влияние системы рестрикции-модификации EcoKI на интеграцию протяжённых фрагментов ДНК в хромосому *E. coli*. Авт. успешно преодолевает это ограничение, вводя в плазмиду-помощник известные гены белков (из бактериальных фагов и плазмиды) с антирестрикционными функциями и подбирает наилучший из них. В дальнейшем, после небольших модификаций, разработанный инструментарий успешно тестируется в трёх представителях Enterobacteriales.

Список цитируемой литературы включает 185 наименований источников только на англ. языке. В то же время, известны публикации по данной теме и в русскоязычных журналах.

Заключение по работе

Рецензируемая работа выполнена на высоком теоретическом и практическом уровне, имеет логику и является законченным исследованием. Научная новизна работы состоит в создании нового оригинального инструментария для редактирования геномов грамотрицательных бактерий. Практическая ценность работы следует из её актуальности, описанной выше.

Все поставленные задачи исследования выполнены. Выводы, сделанные в работе, соответствуют целям и задачам исследования. Положения, выносимые на защиту, подтверждены полученными экспериментальными результатами. По материалам диссертации опубликовано необходимое для её защиты количество статей.

Обращают на себя внимание следующие недостатки, связанные, в основном, с оформлением работы.

1. Автор разработал инструментарий, но не приводит полный протокол его использования.
2. Диссертация написана не всегда понятным языком, в том числе, это касается статистической обработки результатов (стр. 68, стр. 95).
3. Имеет место небрежность оформления: пропуски слов (см. первое предложение введения, например), предлогов («инкубировали полипропиленовой пробирке», например), грамматические ошибки (например, «в отсутствие» вместо «в отсутствии» на протяжении всей диссертации).
4. Автор активно пользуется сленгом, употребляемым в лаборатории: «нокаутные штаммы», «библиотека оверэксперссий», «фрагмент затупили», «предок» и т.д.
5. Ссылки на работы двух авторов по тексту включают фамилию только одного автора.

Отмеченные недостатки носят рекомендательный характер и не снижают значимости диссертационной работы Бубнова Д. М. «Инструменты интеграции в геном *Escherichia coli* и других представителей порядка *Enterobacteriales*». Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует заявленным специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология (биологические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном

университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Бубнов Дмитрий Михайлович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология (биологические науки).

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент, старший научный сотрудник,
Акционерное общество «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика»

Дорошенко Вера Георгиевна

27.11.2023

Контактные данные:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Адрес места работы:

117545, г.Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1, корп. 1

Акционерное общество «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика», лаб. 1

Тел.: +7(495) 780-3378 доб(*) 502; e-mail: vera_doroshenko@agri.ru

Подпись Дорошенко В.Г. заверяю:

Менеджер по административным вопросам и персоналу

АО «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика»

Некошнова Е.И.

27.11.2023

