

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 специальности

1.5.11 Микробиология и 1.5.6 Биотехнология

Актуальность

Современные задачи в области исследования биологии бактериальной клетки, микробной биотехнологии, метаболической инженерии и синтетической биологии требуют создания штаммов, обладающих признаками, нехарактерными для вариантов дикого типа. В отличие от прочих типов мутаций, которые вводят с этой целью, особую сложность представляет интеграция массивных фрагментов ДНК, несущих набор отдельных генов или оперон. Вместе с тем, методы, позволяющие встроить в геном одновременно сразу несколько новых функций, дают возможность проектировать и создавать штаммы с изменёнными свойствами значительно быстрее и, следовательно, ускорить прогресс в фундаментальных исследованиях и развитие прикладных технологий.

Несмотря на активное развитие методологии модификации генетического материала ключевого модельного микроорганизма, *Escherichia coli*, описанные в литературе способы интеграции протяжённых фрагментов ДНК в геном этого объекта являются время- и трудозатратными. Так, в подавляющем большинстве случаев, такие методы требуют объединения целевой последовательности с маркером устойчивости к антибиотику и фланкирующими последовательностями, гомологичными локусу интеграции. Поэтому создание интегративных кассет требует многостадийного конструирования на автономных векторах. В качестве альтернативы прямому отбору рекомбинантов по устойчивости к антибиотику возможно использование негативной селекции, направленной против

нерекомбинантных клеток. С этой целью применяют хоминг-эндонуклеазу I-SceI или систему CRISPR/Cas9. Однако, эти подходы также требуют введения интегративной кассеты на автономном векторе, либо трудоёмкой оптимизации условий эксперимента для каждого локуса интеграции.

Ввиду низкой эффективности рекомбинации линейных молекул ДНК с хромосомой *Escherichia coli*, оба перечисленных метода требуют экспрессии в клетке гетерологичной системы гомологичной рекомбинации Red бактериофага λ . К её отличительным чертам относится способность катализировать рекомбинацию по областям гомологии длиной менее 50 пар нуклеотидов, что позволяет синтезировать интегративные кассеты с помощью ПЦР. Процедура конструирования мутаций с помощью Red-рекомбинации обычно состоит из последовательной интеграции и удаления последовательности, содержащей маркеры прямой и негативной селекции. Последний обычно служит для последующего удаления и повторного использования гена устойчивости к антибиотику. Вместе с тем, достаточно высокая эффективность негативной селекции и частота гомологичной рекомбинации дают возможность использовать маркер негативной селекции для интеграции представляющих интерес конструкций путём отбора рекомбинантов, выживших в селективных условиях. Такой подход позволяет совместить зарекомендовавшую себя технологию инженерии генома *E. coli* с помощью Red-рекомбинации и последовательных этапов прямой и негативной селекции с задачей интеграции немаркированных конструкций. Примечательно, что в этом случае интегрируемые последовательности могут не содержать маркера, в связи с чем исчезает необходимость в многостадийном конструировании, и кассеты могут быть получены в результате единственной полимеразной цепной реакции с любой подходящей матрицы. Таким образом, описанная в диссертации технология интеграции в геном массивных фрагментов ДНК на основе новой эффективной стратегии негативной селекции представляет интерес как для фундаментальных

исследований бактериальной клетки, так и для прикладных биотехнологических задач.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа Д. М. Бубнова построена по традиционному плану и включает: Введение, в котором обосновывается актуальность исследования, приведены цель и задачи, описаны объекты и предмет исследования, теоретическая и практическая значимость работы, приведены основные положения, выносимые на защиту, отражены степень достоверности и апробации полученных результатов; Обзор литературы (глава 1), Материалы и методы (глава 2), Результаты и обсуждения (глава 3), состоящей из 3-х разделов, Заключение, Выводы и Список цитируемой литературы. Работа изложена на 153 страницах (с использованием шрифта Times New Roman, 14-й кегль, с полуторным интервалом), содержит 29 рисунков и 5 таблиц. Список литературы включает 185 источников.

В первой главе представлен Обзор литературы, состоящий из 5-ти разделов и занимающий 31 страницу. Проведен анализ научной литературы, посвящённой исследованию механизма гомологичной рекомбинации Red бактериофага λ и свойства компонентов Red – белков Gam, Bet и Eho. В обзоре описаны существующие сценарии использования Red для модификации бактериального генома. В отдельном разделе приводятся сведения о подходах к удалению селективных маркеров из генома и известных стратегиях негативной селекции, используемых с этой целью. Последний раздел посвящен ограничениям методов генетической инженерии с использованием Red, в частности, недостаткам подходов к интеграции протяжённых линейных фрагментов ДНК. Обзор литературы оставляет благоприятное впечатление и полностью выполняет функцию введения читателя в проблематику настоящего исследования.

Во второй главе «Материалы и методы» (объемом 26 страниц) описаны объекты исследования, используемые в работе реактивы и материалы, экспериментальные методы, методы математической обработки полученных

данных. Работа выполнена на высоком методическом уровне, в работе используются разнообразные методы микробиологии, бактериальной генетики и генетической инженерии.

В экспериментальной третьей главе диссертационной работы (объемом 47 страницы) представлена доказательная база правомочности сделанных автором выводов и аргументирована новизна полученных результатов. Глава состоит из 3-х разделов. Результаты экспериментальной работы сопровождаются таблицами, рисунками, иллюстрирующими дизайн экспериментов, и диаграммами, отражающими их результаты.

В «Заключении» (на 3-х страницах) диссертант подводит итоги работы и дает оценку их фундаментального и прикладного значения.

Научная новизна

Научная новизна заключается в том, что автор во время выполнения создал несколько прежде неописанных в научной литературе методов направленного мутагенеза бактериального генома и необходимые для их использования структурные элементы. В частности, автором была создана стратегия негативной селекции на основе репрессора транскрипции *CI* бактериофага λ и токсина Нок. Было показано, что *ci-hok* превосходит все описанные в литературе маркеры негативной селекции, а его эффективность достигает предельно возможных значений. Впервые была показана возможность увеличения частоты интеграции неметилированных линейных конструкций в бактериальный геном с помощью подавления активности систем рестрикции и модификации *in trans* в результате коэкспрессии *osr* бактериофага T7 и генов системы гомологичной рекомбинации Red бактериофага λ . Была показана возможность интеграции в произвольные локусы хромосомы синтетических конструкций длиной до 8 т.п.н. с помощью негативной селекции *ci-hok* и *Osr*-опосредованной Red-рекомбинации. Была показана эффективность этого подхода в работе с четырьмя микроорганизмами, принадлежащими к порядку *Enterobacteriales*. В ходе выполнения этой работы автором также был создан репликон, активность

которого контролируется наличием изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида в питательной среде, и показана возможность получения коротких делеций и инсерций в хромосоме без использования методов прямой и негативной селекции.

Научная и практическая значимость

Методы направленной интеграции в бактериальный геном, разработанные и описанные в диссертационной работе Д. М. Бубнова могут быть использованы как для выполнения фундаментальных исследований, так и в прикладных задачах. Стратегию интеграции можно применить для клонирования в составе хромосомы и функционального анализа генов и оперонов из родственных *E. coli* микроорганизмов. Высокая эффективность полученного маркера негативной селекции позволяет использовать его, например, для исследования стабильности поддержания эписом в клетках или для измерения частоты и изучения природы спонтанных структурных перестроек генома. К практическим задачам, в которых применимы описанные методы и конструкции, можно отнести создание изменённых штаммов бактерий, обладающих прежде несвойственными им свойствами, например, способностью к утилизации новых субстратов или продукции ценных органических соединений. Более того, автор в работе приводит пример создания продуцентов L-триптофана и L-треонина, из чего следует, что созданные в ходе работы методы применимы в задачах микробной биотехнологии. Автор демонстрирует функциональность описанных инструментов в ряде энтеробактерий, что потенциально позволяет в дальнейшем адаптировать их для исследования биологии патогенов, таких как *Klebsiella*, *Shigella* или *Yersinia*.

Результаты исследования

Все поставленные задачи исследования выполнены. В целом, работа обладает внутренней логикой, написана понятным научным языком и хорошо иллюстрирована. Выводы, сделанные в работе, соответствуют цели и задачам исследования. Положения, выносимые на защиту, подтверждены

результатами диссертационного исследования. По теме диссертации опубликовано 3 научных работы в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова.

В целом работа Бубнова Д. М. представляет собой законченное научное исследование, актуальность и новизна которого не вызывает сомнений.

Замечания и вопросы

К работе нет принципиальных замечаний. Вопросы конечно имеются, но они касаются прежде всего развития данных исследований в будущем. Из технических замечаний можно отметить следующие:

1. Родовые названия типа *Escherichia* следует писать в тексте полностью только первый раз, затем сокращать до *E*.
2. В литературном обзоре не хватает иллюстраций
3. Двухстраничное описание ориджина репликации pBR322 в разделе «результаты» представляется лишним. Если требуется освежить эти знания у читателя, то можно описать это в литературном обзоре.
4. В таблице 5 для pDL17 стандартное отклонение $1,3 \times 10^3$ практически не отличается от измеряемой величины $1,4 \times 10^3$. Если это не опечатка, то нужно объяснить таким результатам.
5. Хотелось бы в будущем увидеть систему контрселекции типа cI-hok для грамположительных бактерий

Заключение

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Работа «Инструменты интеграции в геном *Escherichia coli* и других представителей порядка *Enterobacteriales*» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует 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, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной генетики, Физтех-школа физики и исследований имени Л.Д. Ландау, ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)» (МФТИ)

Манухов Илья Владимирович

Подпись

Дата 23.11.23

Контактные данные:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
03.02.07 Генетика

Адрес места работы: 141700, Россия, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9. ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)» (МФТИ).

Подпись доктора биологических наук,
главного научного сотрудника,
заведующего лабораторией молекулярной генетики

Манухова Ильи Владимировича удостоверяю:

Учёный секретарь МФТИ



Евсеев Евгений Григорьевич