

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА МГУ.015.2

по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

Решение диссертационного совета от «12» декабря 2023 г. № 40

О присуждении **Бубнову Дмитрию Михайловичу**, гражданину РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Инструменты интеграции в геном *Escherichia coli* и других представителей порядка *Enterobacteriales*» по специальностям 1.5.11 Микробиология и 1.5.6. Биотехнология (биологические науки) принята к защите диссертационным советом 31.10.2023 г., протокол № 34.

Соискатель **Бубнов Дмитрий Михайлович**, 1992 года рождения, в 2014 году окончил специалитет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» на кафедре микробиологии биологического факультета по специальности 03.02.03 – «Микробиология». В период с 01.10.2014 г. по 10.09.2018 г. проходил обучение в очной аспирантуре биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» на кафедре микробиологии по направлению подготовки 06.06.01 – «Биологические науки». Диплом об окончании аспирантуры (№ АА 001038 рег. номер 1801-0506-0106), подтверждающий сдачу кандидатских экзаменов, выдан 11 сентября 2018 г. ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова». Справка об обучении №22/176 от 02.06.2022г., выданная ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», подтверждает сдачу кандидатских экзаменов по специальностям 1.5.11 Микробиология и 1.5.6. Биотехнология (биологические науки).

В настоящее время соискатель работает в должности старшего научного сотрудника Национального биоресурсного центра - Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Диссертация выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор **Нетрусов Александр Иванович**, профессор кафедры микробиологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Официальные оппоненты:

Манухов Илья Владимирович, доктор биологических наук, ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Физтех-школа физики и исследований имени Л.Д. Ландау, лаборатория молекулярной генетики, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией;

Дорошенко Вера Георгиевна, доктор биологических наук, доцент, Акционерное общество «Научно-исследовательский Институт Аджиномото-Генетика», лаборатория 1, старший научный сотрудник;

Калебина Татьяна Сергеевна, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра молекулярной биологии, ведущий научный сотрудник

дали положительные отзывы на диссертацию.

Соискатель имеет 7 опубликованных научных работ, в том числе по теме диссертации – 3 работы, из них 3 статьи (объемом 1,88 п.л.), опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальностям 1.5.11 Микробиология и 1.5.6. Биотехнология (биологические науки):

1. Bubnov D. M., Yuzbashev T. V., Khozov A. A., Melkina O. E., Vybornaya T. V., Stan G. B., Sineoky S. P. Robust counterselection and advanced λ Red recombineering enable markerless chromosomal integration of large heterologous constructs // *Nucleic Acids Research*. 2022. V. 50. – № 15. P. 8947–8960. DOI: doi.org/10.1093/nar/gkac649 (WOS IF 14,9; SJR IF 8,23; Q1) (0,88/0,74) (Здесь и далее в скобках приведён объём публикаций в печатных листах и вклад автора в печатных листах).
2. Bubnov D. M., Yuzbashev T. V., Vybornaya T. V., Netrusov A. I., Sineoky S. P. Excision of selectable markers from *Escherichia coli* genome without counterselection using an optimized λ Red recombineering procedure // *Journal of microbiological methods*. 2019. V. 158. P. 86–92. DOI: doi.org/10.1016/j.mimet.2019.01.022 (WOS IF 2,2; SJR IF 0,47; Q3) (0,44/0,40).
3. Bubnov D. M., Yuzbashev T. V., Vybornaya T. V., Netrusov A. I., Sineoky S. P. Development of new versatile plasmid-based systems for λ Red-mediated *Escherichia coli* genome engineering // *Journal of microbiological methods*. 2018. V. 151. P. 48–56. DOI: doi.org/10.1016/j.mimet.2018.06.001 (WOS IF 2,2; SJR IF 0,47; Q3) (0,56/0,47).

На диссертацию и автореферат поступило 3 дополнительных отзыва, все положительные.

Выбор официальных оппонентов обосновывался компетентностью в соответствующей отрасли науки и наличием публикаций в соответствующей сфере

исследования: Манухов Илья Владимирович является ведущим специалистом в области бактериальных систем рестрикции и модификации, а также антирестрикционных белков; Дорошенко Вера Георгиевна является ведущим специалистом в области методов метаболической инженерии и конструирования штаммов-продуцентов органических соединений на основе *Escherichia coli*; Калёбина Татьяна Сергеевна является ведущим специалистом в области молекулярной биологии клеток микроорганизмов.

Диссертационный совет отмечает, что представленная диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук является научно-квалификационной работой, в которой автор описывает создание стратегии негативной селекции для работы с *Escherichia coli*, основанной на системе, состоящей из R и L промоторов бактериофага λ , их репрессора CI, токсина Нок и гена хлорамфениколацетилтрансферазы. Результаты анализа спонтанных мутантов, сохраняющих жизнеспособность в селективных условиях, свидетельствуют, что эффективность предложенной стратегии достигает предельно высокого значения.

Показано, что система рестрикции-модификации EcoKI существенно снижает эффективность Red-зависимой интеграции неметилированных, в частности, синтезированных с помощью ПЦР, фрагментов ДНК в хромосому *E. coli*. Установлено, что влияние EcoKI может быть снижено или полностью нивелировано в результате коэкспрессии генов Red-рекомбинации и антирестрикционных функций различного происхождения. Были протестированы гены *ral*, *ardA* и *ocr* бактериофага λ , конъюгативной плазмиды ColIb-P9 и бактериофага T7, соответственно. Из результатов экспериментов следовало, что *ocr* обладает наиболее выраженным эффектом и полностью подавляет фенотип эндонуклеазы EcoKI.

Автор демонстрирует, что негативная селекция *cI-hok* в совокупности с *in trans* подавлением активности EcoKI позволяют встраивать в бактериальный геном фрагменты ДНК, содержащие в своем составе целые опероны и синтезированные с помощью ПЦР. В частности, эффективность интеграции в шести произвольно выбранных геномных локусах составляет от 60 до 100%. Тот же подход позволяет переносить между штаммами немаркированные участки хромосомы с помощью общей неспецифической трансдукции бактериофагом P1. В работе описаны примеры использования негативной селекции *cI-hok* и *ocr*-опосредованной рекомбинации в задачах метаболической инженерии, а именно в экспериментах по конструированию продуцентов L-треонина и L-триптофана. Дополнительно, автор в работе показывает, что созданная стратегия интеграции универсальна и применима в работе с несколькими микроорганизмами из порядка *Enterobacteriales*, отличными от *E. coli*.

Диссертационная работа Бубнова Д. М. соответствует пункту 2.1 Положения о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В.Ломоносова.

Диссертация представляет собой самостоятельное законченное исследование, обладающее внутренним единством. Положения, выносимые на защиту, содержат новые научные результаты и свидетельствуют о личном вкладе автора в науку:

1. Создана стратегия негативной селекции на основе системы промоторов P_R/P_L бактериофага λ и её репрессора CI . Анализ спонтанных мутаций, позволяющих клеткам сохранять жизнеспособность в селективных условиях, свидетельствует о предельно высокой эффективности стратегии *ci-hok*.
2. Активность эндонуклеазы $EcoKI$ ограничивает эффективность интеграции неметилированных фрагментов ДНК в бактериальный геном. Подавление $EcoKI$ в результате экспрессии антирестрикционной функции *ocr* бактериофага T7 стимулирует частоту интеграции более, чем на три порядка.
3. В совокупности, негативная селекция *ci-hok* и Red-рекомбинация, дополненная функцией *ocr*, позволяет с высокой эффективностью интегрировать протяженные неметилированные фрагменты ДНК в геном *E. coli*. Помимо этого, этот подход делает возможным перенос участков хромосомы, не содержащих маркеров, между штаммами с помощью трансдукции.
4. Описанная стратегия интеграции не использует функций, специфичных по отношению к конкретным штаммам или видам и, поэтому, применима в работе с различными микроорганизмами, принадлежащими к порядку *Enterobacteriales*.

На заседании 12.12.2023 г. диссертационный совет принял решение присудить Бубнову Д. М. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 6 докторов наук по специальности 1.5.11. Микробиология и 6 докторов наук по специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки), участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 18, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Заместитель председателя совета,
д.б.н., проф.

А.Б. Умарова

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.

Костина Н.В.

12.12.2023 г.