

ОТЗЫВ

на автореферат Д.М. Бубнова,

«ИНСТРУМЕНТЫ ИНТЕГРАЦИИ В ГЕНОМ *ESCHERICHIA COLI* И ДРУГИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПОРЯДКА *ENTEROBACTERIALES*»

на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.11 – микробиология, 1.5.6 – Биотехнология (в том числе
бионанотехнологии)

Диссертационная работа Дмитрия Михайловича Бубнова посвящена разработке новых методов редактирования генома энтеробактерий на основе широко используемой системы Lambda RED. Автор работы адаптировал систему для проведения 2-стадийной негативной селекции, что позволяет получать бесшовные инсерции/делеции/замены в хромосомной ДНК. Стоит отметить, что используя набор уже имеющихся инструментов, автор работы разработал достаточно комплексную, и хорошо-продуманную плазмидную систему позволяющую достичь высокой эффективности редактирования и решающую сразу несколько известных проблем: i) была введена новая схема негативной селекции самой плазмиды, что позволяет работать с системой на 37С, в отличие от широко используемой плазмиды рKD46; ii) использование белка Ocr, подавляющего системы рестрикции-модификации I типа, повысило эффективность редактирования в природных штаммах, рестрицирующих не метилированную ДНК; iii) разработана новая схема негативной селекции для отбора отредактированных клонов, основанная на двух уровнях регуляции через CI репрессор и токсин Нок, что позволило значительно снизить частоту возникновения спонтанных мутантов. Полученная система была применена к решению множества модельных задач, что показало высокую эффективность редактирования ДНК как в “одомашненных” штаммах *Escherichia coli*, так и в не модельных видах энтеробактерий. В связи с этим, актуальность и значимость полученных результатов не вызывает сомнений. Не смотря на это,

предложенная система не обладает очевидными преимуществами перед методиками редактирования основанными на CRISPR-Cas технологиях. Данное замечание не умаляет ценности полученных автором результатов.

Хотелось бы отметить, что автореферат очень хорошо написан и структурирован, логика подготовки каждого из этапов исследования не вызывает вопросов и работа представляет собой пример методического исследования выполненного на очень высоком уровне. Автореферат сопровождается качественными иллюстрациями. Автор работы ответил на все вопросы возникшие в ходе рецензии.

Диссертационная работа Д. М. Бубнова полностью соответствует требованиям, предъявленным к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, и соответствует критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени Ломоносова, а ее автор заслуживает присвоения искомой степени по специальности 1.5.11 – Микробиология, 1.5.6 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Заведующий лабораторией анализа метагеномов,
Сколковский Институт Науки и Технологий,
Исаев Артем, к.б.н.

13 ноября 2023

Артем Исаев А.

