

## ВІДГУК

**офіційного опонента на дисертаційну роботу Кошля Оксани Тарасівни на тему: “Вивчення механізмів трансляційної регуляції експресії генів у *Streptomyces albus* SAM2”, подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.**

**Актуальність теми дисертації.** Антибіотики належать до числа основних продуктів сучасної біотехнології та активно застосовуються в медицині та ветеринарії. Більшість відомих сьогодні антибіотиків продукують стрептоміцети, що є одними з найчисельніших і найбільш розповсюджених ґрунтових бактерій. Однак, проблемою є набуття множинної стійкості патогенними мікроорганізмами до вже наявних антибіотиків. Значної уваги потребує вивчення потенціалу стрептоміцетів до синтезу нових сполук. Секвенування та аналіз геномів виявили значну кількість кластерів генів вторинних метаболітів, що за лабораторних умов є мовчазними. Механізми, що лежать в основі контролю експресії цих генних кластерів, становлять великий практичний інтерес, оскільки можуть привести до відкриття нових антибіотиків, в яких постала вкрай гостра потреба. Вивчення механізмів регуляції вторинного метаболізму до якого належить біосинтез антибіотиків є однією з центральних проблем молекулярної генетики та біотехнології мікроорганізмів. Регуляція метаболізму стрептоміцетів є складною. Значний інтерес дослідників довгий час був спрямований на регуляцію вторинного метаболізму за участі транскрипційних факторів. Накопичення нових даних транскриптоміки, протеоміки та метаболоміки дає змогу виявити нові, не менш важливі рівні регуляції експресії генів. Одним із таких рівнів є трансляційна регуляція, яка впливає на метаболізм через зміни точності, ефективності та вибірковості трансляції мРНК. Вивчення механізмів, що впливають на трансляційну регуляцію експресії генів стрептоміцетів дасть змогу глибше зрозуміти ті

фундаментальні процеси, що лежать в основі білкового синтезу певних груп мРНК та використати ці дані для конструювання штамів із заданими властивостями. Дана робота присвячена розробці системи для дослідження трансляційного рівня регуляції експресії генів у стрептоміцетів; апробації цієї системи для вивчення ролі мутацій за генами рибосомного білка S12 та посттранскрипційної модифікації тРНК у морфогенезі та продукції антибіотиків. Вивчення трансляційної регуляції біосинтезу антибіотиків забезпечить можливість розробити підходи до конструювання їх продуцентів. Дисертаційна робота Кошля О.Т. присвячена вивченню механізмів трансляційної регуляції експресії генів стрептоміцетів, а тому її актуальність не викликає жодного сумніву. Поставлені дисертантом мета і завдання роботи є логічними для розв'язання проблеми, а вибрані методичні прийоми відповідають сучасному стану світової науки.

**Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами.** Робота дисертанта є частиною фундаментальних досліджень науково-дослідної лабораторії генетики, селекції та генетичної інженерії продуцентів біологічно активних речовин (НДЛ-42) кафедри генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка. Роботу виконано у межах бюджетних тем БГ-41Нр “Універсальний генетичний механізм контролю продукції біологічно активних речовин стрептоміцетами” (№ державної реєстрації 0116U008070, 2016-2018 рр.) і Ф80/2-2018 “Посттранскрипційні модифікації тРНК як регулятори первинного й вторинного метаболізму в актинобактерій” (№ державної реєстрації 0118U000406, 2018 р.).

**Новизна дослідження.** Дисертаційна робота Кошля О.Т. містить низку нових наукових результатів. Так, у результаті проведеної роботи сконструйовано делеційний мутант *Streptomyces albus* за геном *bldA* та доведено, що штам нездатний експресувати ТТА-вмісні гени. Вперше класифіковано гени білків, що задіяні в посттранскрипційних модифікаціях тРНК стрептоміцетів. Вперше отримано делеційні мутанти стрептоміцетів за цими генами та доведено їх функцію шляхом хімічного аналізу модифікацій нуклеозидів тРНК; описано властивості мутантних штамів, зокрема їхній

морфотип, здатність синтезувати вторинні метаболіти та вплив відсутності модифікацій на експресію репортерних білків. Отримано низку меродиплоїдних штамів *S. albus* за геном *rpsL*, що кодує рибосомний білок S12 та описано вплив такого стану гена на вторинний метаболізм і загальні процеси росту та стійкості до антибіотиків. Отримано нові дані про регуляторні процеси на трансляційному рівні контролю експресії генів та їхнє місце в уже описаних регуляторних каскадах. За новизною досліджень робота повністю відповідає вимогам ДАК.

**Теоретичне значення результатів досліджень.** Отримані результати мають важливе фундаментальне значення для розуміння особливостей регуляції синтезу антибіотиків в модельному штамі *S. albus*.

У представленій роботі досліджуються механізми трансляційного рівня експресії генів. Зокрема, вивчено механізми посттранскрипційної модифікації нуклеозидів тРНК стрептоміцетів, які раніше для цих організмів не досліджувались. Як відомо, модифікації тРНК необхідні для оптимізації процесів трансляції, її швидкості та точності. Гіпомодифікація чи повна відсутність модифікацій певних позицій тРНК значним чином впливає на процес декодування мРНК. Значну теоретичну цінність має побудова схеми біосинтезу Міа-залежних модифікацій позиції А37 тРНК. Для стрептоміцетів ці дослідження проведені вперше.

**Практичне значення результатів досліджень.** Практичне значення полягає у можливості використання отриманих даних підвищення відомих та активації продукції нових біологічно активних речовин. Отримані в ході роботи дані, плазміди, штами *E. coli* і стрептоміцетів використовують у навчальному процесі на кафедрі генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка. Частина результатів цієї роботи увійшла до патенту України на корисну модель №120622 «Спосіб підвищення синтезу полікетидних сполук у *Streptomyces albus* J1074».

**Методологічний рівень досліджень.** У роботі використано широкий арсенал сучасних мікробіологічних (культивування мікроорганізмів, вивчення динаміки їх росту і спороутворення, світлова мікроскопія, електронна сканувальна мікроскопія) та молекулярно-біологічних методів

(виділення і рестрикційний аналіз хромосомної і плазмідної ДНК, сумарної РНК, клонування генів, конструювання делеційних мутантів та плазмід для надекспресії окремих генів, ПЛР, генерація та опис мутацій, трансформація клітин *E. coli* плазмідними та лінійними молекулами ДНК, кон'югаційні міжродові схрещування *E. coli* – *Streptomyces*), біохімічних (екстракція і аналіз вторинних метаболітів стрептоміцетів, кількісний та якісний аналіз антибіотиків). У роботі широко використовувались методи комп'ютерного аналізу послідовностей ДНК та білків на базі даних структури геномів мікроорганізмів.

**Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Дисертація є цілісним дослідженням, її мета і завдання чітко сформульовано. Кошпа О.Т. застосувала у своїй роботі сучасні методи молекулярної генетики, геноміки, генетичної та біохімічної інженерії, мікробіології, аналітичної біохімії та біоінформатики. Для досягнення завдань і мети роботи використано та сконструйовано 34 штами мікроорганізмів, та 35 плазмід; методами біохімічного аналізу визначено рівні продукції моеноміцинів, аранціаміцину та інших антибіотиків. Положення, сформульовані в роботі, проілюстровані великою кількістю таблиць і рисунків. Список літератури включає 186 посилань. Результати опрацьовано статистично та обговорено з урахуванням сучасної наукової літератури. Виклад матеріалу відповідає поставленій меті та завданням дисертаційної роботи. Зміст автореферату та основні положення самої дисертації – ідентичні. Висновки, зроблені здобувачем, логічно випливають з отриманих результатів. Тому достовірність положень та висновків й рекомендацій, сформульованих у дисертації, не викликає сумніву.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті.** За темою дисертаційної роботи опубліковано 22 наукові праці, включаючи 7 статі у фахових наукових журналах, 1 патент України на корисну модель, а також 14 тез доповідей у матеріалах конференцій, наукових з'їздів та конгресів. Сумарний імпаکت-фактор статей за темою дисертації складає 8,7. Публікації достатньо повно висвітлюють основні

положення дисертаційної роботи і опубліковані у фахових журналах. Здобувач доповів матеріали дисертаційної роботи на багатьох вітчизняних з'їздах і симпозиумах та одній міжнародній науковій конференції.

Незважаючи на високий рівень дисертаційної роботи, виникають деякі питання/побажання до дисертанта:

1. В результатах досліджень при конструюванні штамів з надекспресією цільових генів не було представлено прямих доказів підвищення експресії відповідних генів (наприклад із застосуванням напівкількісної ПЛР із зворотною транскрипцією).

2. У розділі 3.3.6. Вплив стресових умов на фенотип штамів *ΔmiaA* та *ΔmiaB*, виявлено цікавий феномен, а саме, гало пригнічення росту *ΔmiaA* навколо дисків з перекисом водню було практично стерильним, тоді як для *ΔmiaB* та SAM2 – заповнені численними колоніями. Слід обговорити цей феномен, висунути гіпотези для пояснення отриманого результату.

3. У розділі 3.3.9. описано комплементацию мутації *ΔmiaA* геном *adpA* *S. albus*, що не містив ТТА кодону. Чому не проводили комплементацию мутації *ΔmiaB* тим самим геном.

4. Цікаво було би дослідити вплив нокаута *bldA* на мутацію *ΔmiaB*, як це було зроблено для мутантного штаму *ΔmiaA* та описано у розділі 3.3.9.

5. Висновки треба подавати у стверджувальній формі, зокрема у висновку 1 замість - *можна тлумачити як*, доцільніше вжити - *свідчить.*'

6. Зауваження технічного характеру вказано на полях тексту дисертації. Деякі з них наведено нижче, зокрема, треба усунути жаргонні вислови: с. 35 *акуратність, гіперакуратність рибосом*, с. 64 *краплинково наносили*, с. 117 *наймовірніше* і ін.

### **Висновок.**

Отже, на основі проведеного аналізу дисертаційної роботи і опублікованих праць, із врахуванням актуальності, новизни, наукової та практичної цінності розв'язуваної проблеми, обґрунтованості сформульованих наукових висновків та достовірності отриманих результатів,

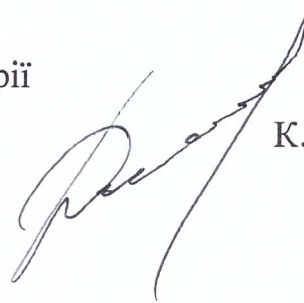
самостійності в отриманні ключових результатів роботи вважаю, що рецензована дисертаційна робота цілком відповідає вимогам, що ставляться ДАК України до кандидатських дисертацій, і її можна рекомендувати для подання до захисту для здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – «молекулярна генетика».

Рецензент,

доктор біологічних наук, с. н. с.

завідувач лабораторії метаболічної інженерії

Інституту біології клітини НАН України



К.В. Дмитрук

м. Львів, 9 січня 2020 р.

Підпис д. б. н. Дмитрука К.В. засвідчую:

Учений секретар

Інституту біології клітини НАН України

канд. біол. наук



М.Л. Барська