

**Відгук офіційного опонента на дисертаційну роботу**  
**Кошли Оксани Тарасівни**  
**«Вивчення механізмів трансляційної регуляції експресії генів у**  
***Streptomyces albus* SAM2», представлену на здобуття наукового ступеня**  
**кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна**  
**генетика**

**Актуальність теми.** Стрептоміцети, що належать до класу *Actinobacteria* (актинобактерії), становлять певний інтерес для вивчення, у першу чергу, через їхню здатність до синтезу низки вторинних метаболітів (ВМ). Ці сполуки мають важливе промислове значення, зокрема як протибактерійні (стрептоміцин), протигрибкові (ністатин), протигельмінтні (авермектин) та протипухлинні (доксорубіцин) антибіотики. Близько 60% антибіотиків мікробного походження продукується стрептоміцетама в промисловості. Однак, набуття множинної стійкості патогенними мікроорганізмами до вже наявних антибіотиків та той факт, що за останні 30 років жодного принципово нового класу антибіотиків не було розроблено є нагальною проблемою.

Втім, потенціал до синтезу нових сполук стрептоміцетів ще не вичерпано. Секвенування та аналіз геномів виявили значну кількість кластерів генів ВМ (близько 20-45 кластерів на геном), що за лабораторних умов є криптичними, тобто не експресуються, або експресуються на дуже низькому рівні. Механізми, що лежать в основі контролю експресії цих генних кластерів, становлять неабиякий практичний інтерес, оскільки можуть привести, наприклад, до відкриття нових антибіотиків, в яких наразі постала вкрай гостра потреба.

Регуляція метаболізму стрептоміцетів містить ієрархічно підпорядковані каскади, є надзвичайно складною, тісно скоординованою в часі та з умовами середовища. Значний та виправданий інтерес дослідників довгий час був спрямований на регуляцію вторинного метаболізму мережею 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 (в тому числі і мРНК, необхідних для синтезу різних класів ВМ) та

використати ці дані для раціонального конструювання штамів із необхідними властивостями. Отже, робота має важливе теоретичне й практичне значення.

**Зв'язок роботи з державними науковими програмами, планами.** Дисертацію виконано у науково-дослідній лабораторії генетики, селекції та генетичної інженерії продуцентів антибіотиків (НДЛ-42) при кафедрі 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.).

**Оцінка обґрунтованості наукових положень, висновків, сформованих у роботі.** Дисертація Кошли О.Т. становить завершену наукову роботу, що містить всі необхідні структурні елементи від обґрунтування актуальності та стратегії дослідження, до аналізу отриманих результатів та висновків. Частина дисертаційної роботи викладені послідовно та логічно зв'язані між собою. Наведене обґрунтування для вибору кожного методу дослідження, всі експериментальні дані супроводжуються ґрунтовним аналізом.

Експериментальні результати були опрацьовані з використанням загальноприйнятих методів статистичної обробки даних.

Також було проведено порівняння отриманих результатів з результатами, описаними у світовій літературі іншими дослідниками. Виходячи з аналізу та узагальнення результатів дисертації, було показано, що мета дисертаційної роботи була повністю досягнута в ході виконання дослідження, а дисертація є завершеною науковою кваліфікаційною працею.

Завершується робота вичерпними розгорнутими висновками, які логічно описують досягнені результати та відображують наукове та практичне значення дисертаційної роботи.

**Повнота викладення основних результатів роботи в наукових фахових виданнях.** Ключові положення дисертаційної роботи були висвітлені у низці наукових праць дисертанта. За темою дисертації опубліковано 22 наукові роботи, серед яких 7 статей у фахових журналах, один патент України на корисну модель та 14 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних науково-практичних конференціях та з'їздах. Наукові публікації за темою дисертації відповідають чинним вимогам законодавства України.

**Оцінка змісту дисертації та її завершеності.** У дисертаційній роботі чітко та науково коректно сформульовано мету, яка відображається у поставлених завданнях, визначено об'єкт та предмет роботи. Вичерпно обґрунтовано актуальність поставленої проблеми, та використання тих чи інших експериментальних методів. Викладення експериментального матеріалу структурно та змістовно відповідає поставленим завданням.

Дисертація складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел (186 найменувань) та додатків. Роботу викладено на 167 сторінках машинописного тексту (114 сторінок основного тексту), і проілюстровано 44-ма рисунками та 8-ма таблицями.

У першому розділі (огляді літератури) розглянуто сучасні дані щодо регуляції морфогенезу і вторинного метаболізму стрептоміцетів. Описані фенотипові прояви мутацій генів *rpsL* (кодує рибосомний білок S12) та *bldA* (кодує тРНК<sup>лейUUA</sup>, що єдина розшифровує найрідкісніший для геномів стрептоміцетів кодон ТТА), що змінюють експресію генів на рівні трансляції. Окрім цього, охарактеризовано важливу роль посттранскрипційних модифікацій нуклеозидів тРНК для їхнього функціонування і нормального перебігу процесу трансляції.

Розділ «Матеріали та методи» містить вичерпний та детальний опис матеріалів та методів використані в ході експериментального дослідження. Так, описано мікроорганізми, які використовуються в роботі, методи їх культивування та оцінки накопичення біомаси та вторинних метаболітів. Детально описано методіку трансформації клітин *E. coli*, міжродової кон'югації *E. coli* – *S. albus*, проведення біотестів для визначення антибіотичної активності штамів *S. albus*, визначення активності β-глюкуронідази в лізатах біомаси *S. albus*.

В розділі 3 (експериментальна робота) описано розробку на основі штаму *Streptomyces albus* SAM2 експериментальної моделі для вивчення процесів, що впливають на експресію генів на рівні трансляції у стрептоміцетів. З її допомогою, досліджено вплив меродиплоїдного стану гена *rpsL* на метаболізм штаму *S. albus* SAM2. Сконструйовано та описано фенотипи делеційного мутанта SAM2 за геном лейцил-тРНК *bldA* та властивості делеційних мутантів *Streptomyces albus* SAM2 за генами, що кодують білки посттранскрипційних модифікацій нуклеозидів тРНК.

Розділ «Аналізу та узагальнення результатів досліджень» містить ґрунтовний аналіз отриманих результатів, та їх обговорення. Наведене

порівняння отриманих результатів із сучасними світовими розробкам у галузі механізмів трансляційного процесу.

У висновках розкрито як наукове, так і практичне значення дисертації.

Ознайомлення з текстом автореферату дисертації дає підстави стверджувати, що за структурою та змістом він відповідає вимогам, що висуваються МОН України. У тексті автореферату відображено основні положення, зміст, результати і висновки здійсненого Кошлюю О. Т. дисертаційного дослідження.

**Наукова новизна роботи.** У дисертаційному дослідженні вперше класифіковано гени білків, що задіяні в посттранскрипційних модифікаціях тРНК стрептоміцетів та отримано делеційних мутантів стрептоміцетів за цими генами та доведено їх функцію шляхом хімічного аналізу модифікацій нуклеозидів тРНК. Також у дисертаційній роботі створено делеційного мутанта *S. albus* за геном *bldA* та доведено, що штам нездатний експресувати ТТА-вмісні гени. Отримано нові дані про регуляторні процеси на трансляційному рівні контролю експресії генів та їхнє місце в уже описаних регуляторних каскадах, 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 рибосомного білка S12 – *rpsL* – та описано вплив такого стану гена на вторинний метаболізм і загальні процеси росту та стійкості до антибіотиків.

**Практичне значення одержаних результатів.** Практичне значення полягає у можливості використання отриманих даних для підвищення продукції відомих та активації біосинтезу нових біологічно активних речовин. Отримані в ході роботи дані, плазмідні, 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”.

**Зауваження та побажання.**

Робота містить певну кількість недоліків, які однак, не є принципово значущими для оцінки її загального наукового значення.

1. У анотації дисертації (ст. 2) описується, що штам *Streptomyces albus* SAM2 було обрано як модельний організм, через те, що він є «простим для геномної інженерії». Відповідно потребує пояснення його переваги («простота») для генної інженерії в порівнянні з іншими модельними мікроорганізмами родини *Streptomyces*.

2. У анотації дисертації (ст. 3) написано, що зважаючи на активізацію вторинного метаболізму (як власного, так і гетерологічного) за додаткового внесення алеля *rpsL*<sup>L90K</sup>, меродиплоїдні штами становлять практичний інтерес. Виходячи з цього твердження, постає питання в чому саме виражається активізація вторинного метаболізму меродиплоїдних штамів.

3. В «Огляді літератури» на ст. 36 введено поняття фітнес-кошт. Це не зовсім вдалий переклад, бажано його заміти на «міра пристосування».

4. В «результатах досліджень та їх обговоренні» на сторінці 61 зазначено: «внесення додаткових алелів K88E чи GI92 практично повністю пригнічувало синтез протимікробних метаболітів при рості стрептоміцетів на SG2, однак активізувало синтез останніх на R5». Відповідно, потребує пояснення або припущення, чому за умов внесення додаткових алелів штам стає селективним за середовищем.

5. На сторінках 61-62 зазначено «після селекції та кількох пересівів на середовищі з апраміцином, висіваючи розведення штаму K88R\_ex ara+ на середовище ISP3 помітили утворення двох типів колоній: таких, що не споруювали і надпродукували аранціаміцин та споруюючих, однак з накопиченням менших кількостей антибіотика», однак, не має жодного припущення або пояснення цього явища.

6. На сторінці 64 описано: «Визначали виживання колоній при рості на середовищі TSA з додаванням стрептоміцину до кінцевої концентрації 100 мкг/мл». Однак, надалі описано «Для цього штами SAM2, K88E (гомозиготний) та K88E\_ex (меродиплоїдний стан *rpsL*), що не піддавались попередній дії стрептоміцину, вирощували в рідкому середовищі TSB, а потім по 10 мкл культури та тисячного, десятитисячного і стотисячного розведень краплинково наносили на чашки без антибіотика (для оцінки концентрації КУО) та зі 100 мкг/мл стрептоміцину для виявлення стійких КУО». Отже, визначали не виживання однієї колонії, а життєздатність всієї культури при високих концентраціях стрептоміцину. Це не зовсім вдалий вислів.

7. На сторінці 64 міститься постулат: «чим вища кількість КУО (або ж біомаси) культури нанесена на чашку, тим вища імовірність виявити серед них клони стійкі до стрептоміцину». Чи є тотожним для актиноміцетів поняття біомаси та колонієутворюючої одиниці?

8. На сторінці 107 рис. 3.34 не зрозумілим є вибір терміну культивування для вибору проб на  $\beta$ -глюкуронідазну активність штамів, чому саме проби відбирали на 19, 25, 43, 49, 73 години?

9. В роботі показано різницю різних мутантних штамів відносно вихідного, як за морфологією так і за біохімічними властивостями. Однак, не сказано, чи зберігається така морфологія та властивості протягом багатьох пересівів, чи штами повертаються до морфології та біохімічних властивостей вихідного штаму.

10. Кількість завдань та висновків не співпадають, завдань 5, а висновків 7.

11. Також дисертація містить незначну кількість пунктуаційних помилок, лабораторного жаргону та використання невиправданих скорочень термінології.

Однак, зазначені зауваження не впливають на загальне позитивне враження від роботи та мають в тому числі дискусійний характер. Загалом же дисертаційна робота написана на досить високому науковому рівні.

**Загальний висновок.** Таким чином, дисертаційна робота Кошли Оксани Тарасівни «Вивчення механізмів трансляційної регуляції експресії генів у *Streptomyces albus* SAM2» являє собою закінчену науково-дослідну роботу, яка містить рішення актуального завдання щодо розроблення експериментальної моделі для дослідження трансляційного рівня регуляції експресії генів у стрептоміцетів на основі штаму *Streptomyces albus* SAM2 та використання цієї моделі для вивчення ролі мутацій за генами рибосомного білка S12 та посттранскрипційної модифікації tРНК у морфогенезі та продукції антибіотиків. Актуальність обраної проблеми, високий методичний рівень проведених досліджень, наукове й практичне значення отриманих результатів дозволяє вважати, що дисертаційна робота Кошли О. Т. відповідає вимогам до дисертаційних робіт на здобуття наукового ступеню кандидата наук, зокрема пп. 9 та 11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 (із змінами). Кошла О. Т. заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 –молекулярна генетика.

**Офіційний опонент:**

кандидат біологічних наук,  
науковий співробітник відділу  
молекулярної біотехнології та  
геноміки, лабораторії харчової  
та промислової біотехнології



О.О. Тігунова

Підпис к.б.н. О.О. Тігунової засвідчую:

учений секретар  
к.б.н., с.н.с.



НАН України

Я.В. Тірко