

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу Андрєєвої Юлії Андріївни на тему:
**«МЕХАНІЗМИ ДІЇ НОВИХ РЕГУЛЯТОРНИХ ФАКТОРІВ СИНТЕЗУ
РИБОФЛАВІНУ У ФЛАВІНОГЕННИХ ДРІЖДЖІВ»**, яка виносить на
захист для здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за
спеціальністю **091 - Біологія**.

Ознайомившись із дисертаційною роботою Андрєєвої Ю.А. вважаю, що вона є сучасним науковим дослідженням в галузі метаболічної інженерії та біотехнології мікроорганізмів, що ставить за кінцеву мету конструювання ефективних генно-інженерних продуцентів рибофлавіну.

Актуальність теми дослідження: Підвищення продуктивності дріжджових продуцентів вітаміну В₂ (рибофлавіну) без сумніву є актуальним завданням сучасних біотехнологічних досліджень. Це зумовлено декількома факторами, зокрема: і) важливістю похідних рибофлавіну коферментів флавінмононуклеотиду (ФМН) та флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) для ключових метаболічних шляхів і відповідно здоров'я людини, враховуючи, що рибофлавін організмом ссавців не синтезується; ii) зростанням міжнародного ринку біосинтетичного рибофлавіну як компонента лікарських засобів, продуктів харчування, косметичних засобів та кормових додатків у тваринництві; iii) певними технологічними перевагами дріжджів як мікробних продуцентів над альтернативними платформами (бактерії, цвілеві гриби), зокрема можливістю адаптації для виробництва дешевих ростових субстратів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами Дисертаційна робота була виконана як інтегральна частина досліджень відділу Молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАН України, а також у межах досліджень за грантом Польського національного наукового центру (NCN) Opus UMO-2018/29/B/NZ1/01-497 – “Regulatory mechanism involved in riboflavin overproduction in the flavinogenic yeast *Candida famata*”.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація містить наступні розділи: «Анотація», "Вступ", "Огляд літератури", "Матеріали та методи", "Результати та їх обговорення", "Аналіз та узагальнення результатів", "Висновки" та "Список використаних джерел". Дисертацію викладено на 130 сторінках друкованого тексту, з них основна частина займає 69 сторінок. Робота містить 19 рисунків, 8 таблиць та 3 додатки. Список використаної літератури налічує 191 джерело літератури.

Мета й завдання роботи сформульовані логічно.

У роботі були використані сучасні методи молекулярної генетики, біохімічних досліджень та клітинної біології, біоінформатики, а також класичні підходи мікробіології.

Наукова новизна отриманих результатів.

Метою дослідження була ідентифікація та дослідження дії чинників, залучених у процеси регуляції біосинтезу рибофлавіну флавіногенними дріжджами *C. famata*.

На відміну від інших робіт, присвячених регуляції експресії генів біосинтетичного шляху флавіногенезу, залучених у перетворення флавінових попередників ГТФ та Ру5Ф у вітамін В₂, дана робота досліджує додаткові фактори, зокрема вплив модуляції експресії транскрипційного фактора Sef1, - позитивного регулятора флавіногенезу у дріжджів *C. famata*. В межах виконаної роботи вперше виявлено, що лише під промоторами з

флавіногенних дріжджів експресія гена *SEF1* веде до збільшеної продукції рибофлавіну. Вперше підтверджено, що для дріжджів *S. famata* вакуолярна АТФ-аза, кодована геном *VMA1*, відіграє роль негативного фактора флавіногенезу, а її делеція значно підвищує синтез рибофлавіну. Показано, що збільшення продукції попередника рибофлавіну Р_{у5Ф} шляхом надекспресії гена *GND1*, що кодує фермент пентозофосфатного шляху 6-фосфоглюконатдегідрогеназу, підвищує біосинтез рибофлавіну. При цьому надсинтезу рибофлавіну можна також досягти на лактозі,- дешевому ростовому субстраті у складі молочної сироватки. Вперше показано, що специфічна екскретаза рибофлавіну, кодована геном *RFE1*, надекспресія якої підвищує продуктивність біосинтезу рибофлавіну у *S. famata*, локалізується у плазматичній мембрані.

Теоретичне та практичне значення результатів дисертації

Теоретичне значення дисертації полягає в обґрунтуванні на моделі *S. famata* можливості маніпуляції рядом додаткових генетичних факторів, таких як гени транскрипційних регуляторних факторів, ферментів пентозофосфатного шляху, АТФаз, екскретаз тощо, з метою оптимізації продуцентів рибофлавіну у флавіногенних дріжджів.

Практичне значення наукових результатів полягає у можливому використанні виявлених закономірностей регуляції синтезу рибофлавіну для конструювання нових стабільних надпродуцентів вітаміну шляхом їх комбінації. За умови стабільності, такі продуценти можуть бути впроваджені у реальне виробництво.

Використання результатів роботи Результати роботи можуть бути використані у практичній біотехнології (виробництві рибофлавіну), а також при підготовці навчальних курсів з біотехнології мікроорганізмів.

Особиста участь автора в отриманні та обґрунтуванні наукових та практичних результатів, що викладені в дисертаційній роботі, не викликає сумніву. Дисертант брала безпосередню участь у плануванні, підготовці, та виконанні поставлених експериментальних задач, а також у підготовці публікацій за темою дисертації. У роботі наводяться необхідні посилання на вклад інших співавторів публікацій та попередній доробок, використаний у ході викання експериментальних досліджень.

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у вигляді наукових статей у профільних журналах та представлено у формі тез усних або стендових доповідей наукових конференцій. Загалом за темою дисертації опубліковано 10 наукових робіт, що охоплюють усі розділи дисертації, з яких 3 статті у виданнях переліку Scopus, та 7 тез доповідей конференцій. Слід відзначити дві публікації у провідному фаховому журналі Yeast (Q2), у яких здобувач є першим та другим автором.

Відзначаючи **серйозний науковий та методологічний рівень роботи**, а також її якісне оформлення, до роботи однак виникло ряд нижче перелічених зауваг і запитань:

Розділ «Результати досліджень та їх обговорення»:

Підрозділ 3.2

Стор 68 «Транскрипційний фактор *Sef1* є одним із позитивних регуляторів синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджах, зокрема у *S. famata*. Ген цього фактора також присутній в геномах нефлавіногенних дріжджів, проте там він не бере участі у синтезі рибофлавіну.» – Варто у тексті вказати, у яких регуляторних процесах бере участь *Sef1* у нефлавіногенних дріжджів, а також яка гомологія, загальна та у зоні ДНК-зв'язуючих доменів, у білків *Sef1* з різних видів дріжджів. Чи є філогенетична спорідненість (групування) білків *Sef1* саме з флавіногенних видів?

Стор. 70 «Штами (примітка: трансформанти делеційною касетою *SEF1*), які не були здатні синтезувати рибофлавін при дефіциті заліза, були відібрані для подальшого аналізу.» Тут, та в інших подібних випадках потрібно вказувати, скільки було проаналізовано трансформантів, який був при цьому відсоток клонів, що виявляли аналізований фенотип, оскільки, як стверджується у роботі, частота гомологічної рекомбінації у цього виду є низькою.

Стор. 71. “Рис. 3.6. «Схема інтеграції делеційної касети (*SEF1*) у геном *S. fatata* з праймерами для ПЛР-верифікації; Б. Електрофореграма ПЛР-продуктів» На електрофореграмі тут, та подібному Рис. 3.2.Б (делеція гену *VMA1*) не показано контроль з ДНК штаму дикого типу з відповідними парами праймерів та контроль для усіх штамів (WT та нокаутів) з праймерами, що виявляють інтактний ген. Вважаю такі контролю необхідними, щонайменше не зайвими. Також потрібно вказати на схемах положення праймерів, що використовувались для клонування плечей делеційних касет.

Стор. 73 Рис. 3.8, Табл. 3.2: Варто було б аналізувати щонайменше по два незалежних трансформанти для кожного аналізованого відповідного вектора (варіантів промоторів), оскільки можлива різна копійність інтеграції та різні випадкові сайти негомологічної інтеграції у геном, що може теоретично впливати на ефективність експресії аналізованого гена. Якщо показники ідентичні, у подальшу роботу беруть один із клонів.

Стор. 75 «Ми припускаємо, що *S. tropicalis* займає деяке проміжне положення між флавіногенними та нефлавіногенними видами «- Для кращого розуміння філогенетичного позиціонування флавіногенних видів дріжджів варто тут навести філогенетичне дерево, яке включає згадані види, та відображає філогенетичне положення флавіногенних видів стосовно біорізноманіття дріжджів, можливо взяти з літератури.

Підрозділ 3.3

Стор. 82 «Мутанти з надекспресією обидвох генів: *L20105/ZWF1/GND1*, *AF-4/ZWF1/GND1* та *BRP/ZWF1/GND1* проявляли лише мінорне збільшення кількості флавінів.» Не зовсім коректно, оскільки відповідні штами не мали значної надекспресії ні на рівні відповідних генів, ні на рівні активностей ензимів, її (одночасної надекспресії двох генів) з певних причин просто не вдалось досягти. Тому слід очевидно змінити означення «надекспресія».

Стор 83-85 розділ 3.3.2. «Вплив надекспресії гена б-фосфоглюконатдегідрогенази на синтез рибофлавіну дріжджами *S. fatata* на мінімальному середовищі з глюкозою та на сироватці.» Чи не аналізували у роботі контроль з мінеральним середовищем із лактозою у концентрації, що є відповідною до концентрації лактози у сироватці? – це було б прямим порівнянням впливу карбонових субстратів на продуктивність синтезу рибофлавіну.

Стор. 89 Таблиця 3.7 «Біомаса клітин, синтез рибофлавіну та вихід рибофлавіну у рекомбінантних штамів *S. fatata* та батьківських штамів на п'ятій день культивування « (примітка: йдеться про експресію гена *SOL3* б-фосфоглюконолактонази.) Потрібно вказати, скільки трансформантів по кожному штаму перевірялось, або як саме обирались з вибірки аналізовані клони.

Стор. 89 «Хоча отримані дані не показали високого позитивного ефекту внаслідок надекспресії гена *SOL3*, ми не виключаємо, що коекспресія генів *SOL3*, *ZWF1* та *GND1* стимулюватиме надсинтез рибофлавіну.» - варто роз'яснити, навіщо включати у такий аналіз ген *ZWF1*, надекспресія якого мала виражений негативний ефект на продукцію рибофлавіну

Підрозділ 3.4

Стор. 91 «Але дисертант дослідив та підтвердив, що *Rfe1* присутній виключно у плазматичній мембрані». Не викликає сумніву, що, згідно наведених даних, *Rfe1* не має домінуючої ядерної локалізації. Але, чи не розглядали варіант, що встановлена «точкова» (dot-like) периферійна локалізація *Rfe1* екскретази може бути не зовсім «виключно мембранною», а, скажімо, ендо-, чи екзосомною? Оскільки локалізація у плазматичній мембрані, як правило, є більш рівномірною, добре було б посприяти у роботі на відповідний контроль, скажімо відомого транспортера плазматичної мембрани, якщо такі відомі у *C. famata*.

Розділ «Аналіз та узагальнення результатів»

Стор. 95 «Ми виявили, що промотори *SEF1* із флавіногенних дріжджів *C. albicans* та *C. tropicalis*, злиті з ВРЗ гена *SEF1* із *C. famata*, відновлюють надсинтез рибофлавіну в *sef1Δ*.» А чи не розглядали можливість проаналізувати структури використаних промоторів (накласти, чи провести пошук відомих регуляторних сайтів у їх складі), і навести у роботі таку інформацію? Тобто, чи є спільні риси між промоторами гену *SEF1* у флавіногенних проти інших видів?

Підсумовуючи, висловлені зауваження не зменшують наукову цінність роботи. Обсяг виконаних досліджень та їх якість в цілому є достатніми для формулювання та обґрунтування наведених висновків. Текст окремих підрозділів роботи потребує певного доопрацювання.

У результаті аналізу вважаю, що дисертаційна робота Андреевої Ю.А. на тему: **«МЕХАНІЗМИ ДІЇ НОВИХ РЕГУЛЯТОРНИХ ФАКТОРІВ СИНТЕЗУ РИБОФЛАВІНУ У ФЛАВІНОГЕННИХ ДРІЖДЖІВ»**, за актуальністю, новизною результатів, науково-практичною цінністю, обґрунтованістю відповідає **«Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)»**, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 р. № 261, наказу МОН України № 40 від 12.01.2017р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», пп. **6, 7, 8 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії»**, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44 та відповідає напрямку наукового дослідження освітньо-наукової програми Інституту біології клітини НАН України з галузі знань 09 – Біологія зі спеціальності 091 – Біологія і може бути рекомендованою до захисту.

Завідувач відділу Сигнальних механізмів клітини
Інституту біології клітини НАН України,
доктор біологічних наук

Стасик О. В.

27 липня 2022 р.