

Відгук  
оформлено 12.11.2019 р.  
Оксана Іванівна  
Варченко  
12.11.2019

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Варченко Оксани Іванівни

### «ВИВЧЕННЯ ГЕТЕРОЛОГІЧНОЇ ЕКСПРЕСІЇ РЕПОРТЕРНОГО ГЕНА GFP В РОСЛИНАХ NICOTIANA RUSTICA L.»

представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії за  
спеціальністю 091 «Біологія» (09 «Біологія»)

#### Актуальність обраної теми

Дисертаційна робота присвячена вивченню особливостей гетерологічної експресії гена *gfp* за транзійтної трансформації рослин тютюну *Nicotiana rustica* L. Питання, що вирішуються в дисертації належать до нагальних фундаментальних проблем біології, а саме: вивчення процесів функціонування та регуляції генів в рослинних організмах і, окрім того, можуть слугувати передумовою для розв'язання ряду прикладних завдань клітинної і молекулярної біології, а також біотехнології. Тема дисертаційної роботи «Вивчення гетерологічної експресії репортерного гена *gfp* в рослинах *Nicotiana rustica* L.» є актуальною в умовах ведення сучасного сільського господарства та розвитку пріоритетних напрямків фармакологічної індустрії, позаяк присвячена дослідженню механізмів і факторів, які є визначальними у процесі отримання продуктів генів інтересу за транзійтної експресії. Актуальність теми дисертаційної роботи підтверджується її зв'язком з науковими темами відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології і генетичної інженерії НАН України: «Розробка біотехнологій отримання природних та гетерологічних сполук в рослинних системах»; «Вивчення впливу стресових факторів біотичного і абіотичного походження на накопичення вторинних метаболітів та рекомбінантних сполук в генетично змінених та нативних рослинних системах».

#### Новизна наукових положень та висновків.

В якості нових наукових результатів дисертанткою висунуто положення, серед яких, на мою думку, найбільш вагомим є проведення порівняльного аналізу експресії репортерного гена *gfp* за використання у процесі транзійтної генетичної трансформації рослин *Nicotiana rustica* L. різних регуляторних елементів: промоторів, сигнальних пептидів, 5'-нетрансльованих послідовностей та термінаторів.

Автором пропонується удосконалена система транзійтної трансформації рослин *Nicotiana rustica* L., за рахунок використання агробактеріальної суспензії із оптимальною оптичною густиною.

### **Практичне значення результатів дослідження.**

Отримані дисертанткою результати дослідження ефективності регуляторних елементів у складі генетичних векторних конструкцій можуть бути використані у процесі розробки оптимальних умов для транзійентної експресії гетерологічних генів у рослинних системах.

Механізми регуляції експресії гетерологічного гена *gfp*, які є предметом дослідження даної роботи, можуть використовуватись в рослинних системах експресії у технологіях отримання рекомбінантних білків, які мають фармацевтичну значимість для медицини і ветеринарії, а також у селекційній практиці в процесі вдосконалення сільськогосподарських культур та декоративних рослин.

### **Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій.**

Достовірність отриманих дисертанткою результатів визначається достатнім об'ємом отриманого експериментального матеріалу та застосуванням для вирішення поставлених задач широкого спектру сучасних молекулярно-біологічних, мікробіологічних та біохімічних методів дослідження. Достовірність отриманих результатів підтверджено статистичними методами.

Викладення власних експериментальних результатів, за допомогою використаних методів, логічно пов'язано з метою та задачами досліджень. Робота добре оформлена і проілюстрована, містить 15 таблиць та 34 рисунки. Висновки чітко сформульовані і відображають основні одержані результати.

Обґрунтованість наукових положень та висновків підтверджено їх обговоренням на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

Результати лабораторних досліджень були підтверджені у виробничих умовах ТОВ «БЕТА НК», що також засвідчує їх достовірність.

### **Повнота викладу основних наукових положень та висновків в опублікованих працях**

Основні наукові положення, висновки та рекомендації, які сформульовані в дисертаційній роботі достатньо повно викладені в авторських публікаціях: О.І. Варченко є автором та співавтором 11 наукових праць, із них дві статті, які індексуються у наукометричних базах даних «Scopus», одна стаття у періодичному науковому виданні іншої держави, яка входить до країн-членів Європейського Союзу, дві статті у наукових виданнях, включених до переліку наукових фахових видань України (усі

включені до міжнародних наукометричних баз даних), шести тезах матеріалів міжнародних та всеукраїнських науково-практичних конференцій.

### **Оцінка змісту та завершеності дисертації.**

Зміст дисертації О.І. Варченко відповідає спеціальності 091 - «Біологія» галузі знань (09 «Біологія»), за якою вона подана до захисту. Результати власних експериментальних досліджень викладені дисертантом послідовно, за загальноприйнятим для подібних робіт стилем. Дисертаційна робота містить традиційні розділи: огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати експериментальних досліджень, висновки та додатки. Список використаних джерел літератури містить 281 посилання. Робота викладена на 176 сторінках машинописного тексту.

У вступі обґрунтовано актуальність обраної теми дослідження, її зв'язок з напрямом роботи установи, де виконано роботу, новизну і практичне значення. В огляді літератури розглядаються технології молекулярного клонування, зокрема технологія Golden Gate та альтернативні їй – Gateway клонування, незалежне від послідовності безлігазне клонування, GoldenBraid клонування та клонування послідовностей без рестрикції. 5 підрозділів огляду літератури присвячені опису механізмів та факторів регуляції експресії генів за участі промоторних послідовностей, 5'-кінцевих нетрансльованих послідовностей, сигнальних пептидів, термінаторних послідовностей та інгібіторів посттранскрипційного замовчування генів. В окремому підрозділі розглядаються системи перенесення генів в рослини, зокрема методи транзійтної трансформації рослин, опосередковані агробактеріями – методу, який лежить в основі практичного виконання дисертаційної роботи. В останньому підрозділі огляду літератури обґрунтовується вибір в якості об'єктів для накопичення рекомбінантних білків рослин *Nicotiana rustica* L. У другому розділі дисертації викладено матеріали і методи дослідження. Аналіз цього розділу засвідчує відповідність обраних методів поставленим задачам дослідження. У третьому розділі представлено результати власних досліджень. У процесі дослідження гетерологічної експресії гена *gfp* в тютюні *Nicotiana rustica* L. автором було створено 19 генетичних конструкцій, які дозволяли дослідити залежність рівня експресії гена *gfp* від наявності в генетичних конструкціях регуляторних елементів – промоторів, сигнальних пептидів, 5'-кінцевих послідовностей, що не трансльовуються, термінаторів та білка-супресора посттранскрипційного замовчування генів. Варченко О.І. також було визначено концентрацію агробактеріальної суспензії, яка є оптимальною для транзійтної трансформації рослин *N. rustica* та досліджено взаємозв'язок між рівнем експресії гена *gfp* та локалізацією рекомбінантного білка в

компартментах клітини. Результати, отримані автором, мають важливе теоретичне значення, позаяк поглиблюють існуючі знання та уявлення щодо механізмів та факторів регуляції експресії генів.

### **Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності**

У дисертаційній роботі Варченко Оксани Іванівни відсутні ознаки порушення академічної доброчесності. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

### **Дискусійні положення та запитання:**

1. В огляді літератури досить детально описано технології молекулярного клонування та механізми регуляції експресії генів, а також методи стабільної та транзійтної експресії генів. У висновку до розділу 1 здобувачка наголошує, що транзійтна експресія генів в рослинних системах стає потужним інструментом для забезпечення синтезу рекомбінантних білків, однак не вказує, що саме вивчення залежності рівня транзійтної експресії генів від активності регуляторних елементів у генетичній конструкції (власне, чому була і присвячена дисертаційна робота), наразі залишається маловивченим або не вивченим взагалі.

2. Ви зауважуєте, що рослини роду *Nicotiana* L. за ефективністю накопичення білків є найкращими для агробактеріальної транзійтної трансформації. Однак, відомо, що одним з недоліків використання рослин тютюну для виробництва фармацевтично важливих білків є високий вміст нікотину та інших токсичних алкалоїдів, які доводиться видаляти в процесі виробництва, що призводить до зростання вартості одержуваних рекомбінантних продуктів. Чи рівнозначна економічна «ефективність» використання у якості платформи для отримання рекомбінантних білків тютюнів та таких культур як салату чи томату?

3. У пункті 2.1.2 «Приготування компетентних клітин *Escherichia coli*» не вказано джерело отримання культури. Окрім того, автор зазначає, що «Компетентні клітини *Escherichia coli* штаму XL-blue або Fasta готували за методикою [223] з модифікаціями», однак не вказує які конкретно модифікації було здійснено чи в чому полягали зміни у методиці. Таке ж зауваження стосується п. 2.2.1. дисертації: «Інфільтрацію листових тканин проводили за методикою [230] із модифікаціями»

4. У дисертаційній роботі не вказані джерела штамів бактеріальних клітин кишкової палички та агробактерій.

5. У роботі наведена конструкція із генетичними елементами, використання яких показали найвищі рівня експресії гена *gfp*, при тому не



була створена конструкція із генетичними елементами, які показали найнижчі рівні експресії, що було б доцільно.

### **Загальна оцінка дисертаційної роботи**

Дисертаційна робота О.І. Варченко є завершеною науковою працею. Дисертантом застосовані самі сучасні методи досліджень і аналізу, опрацьовано велику кількість літературних джерел і якісно проведено їх обговорення і узагальнення. Враховуючи вагоме теоретичне та практичне значення роботи, актуальність теми, наукову новизну одержаних результатів, вважаю, що дисертація Варченко О.І. відповідає вимогам пп. 9,10, 11 і 12 «Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії», затверджену Постановою Кабінету Міністрів України від 6 березня 2019 р. № 167, а її автор, Варченко Оксана Іванівна, заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 - біологія.

### **Офіційний опонент:**

В.о. завідувача лабораторії вірусів рослин,  
старший науковий співробітник  
Інституту мікробіології і  
вірусології НАН України,  
д.б.н

А.М. Кириченко

Підпис   
засвідчено  
завідувачем канцелярії  Коваль Р.В.