

Відзив

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Блаженко Олександри Василівни

«Роль генів початкових етапів метаболізму глутатіону у захисті від стресу у метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha*»,

представленої до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Дисертаційна робота Блаженко О.В. присвячена вивченню початкових етапів метаболізму глутатіону (GSH) та механізмів GSH-залежного захисту від стресу у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*. Зокрема, метою роботи була ідентифікація та з'ясування функції генів, залучених в початкові етапи метаболізму глутатіону та його попередника, цистеїну, у захисті від електрофільного та кадмієвого стресу у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*, шляхом отримання та аналізу рекомбінантних штамів цих дріжджів.

Дослідження метаболізму глутатіону, його регуляції, а також участі глутатіонової системи у захисті від стресу у дріжджів *H. polymorpha* має важливе фундаментальне та прикладне значення. Це обумовлено тим, що метилотрофні дріжджі *H. polymorpha* (інша назва *Ogataea polymorpha*) володіють рядом унікальних властивостей, зокрема, природно високим рівнем внутрішньоклітинного глутатіону та підвищеною толерантністю до різного роду стресів, що робить їх привабливими у біотехнологічному аспекті. Метаболізм глутатіону та його регуляція майже не вивчені у метилотрофних дріжджів, в яких GSH безпосередньо залучений у процесах детоксикації токсичних продуктів метаболізму метанолу, формальдегіду та пероксиду водню. У зв'язку з цим, не виключено, що їм можуть бути притаманні певні особливості метаболізму глутатіону або його регуляції, відмінні від тих, які показані для інших видів дріжджів.

Отже тема роботи є сучасною, перспективною та актуальною. Крім того, ці дослідження також необхідні для отримання потенційних продуцентів глутатіону на базі дріжджів *H. polymorpha*, які є одним з перспективних господарів для продукції рекомбінантних білків на промисловому рівні. Висвітлення

молекулярних механізмів детоксикації одного з найнебезпечніших важких металів, кадмію, дріжджами *H. polymorpha* може послужити основою для подальшого використання клітин даного виду дріжджів для біоремедіації забруднених місць.

Все наведене зумовлює необхідність проведення таких досліджень, яким присвячена дисертаційна робота Блаженко О.В.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Робота відповідає основному плану фундаментальних досліджень, які проводяться у відділі молекулярної генетики і біотехнології Інституту біології клітини НАН України, і виконувалась в рамках декількох бюджетних тем.

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів, ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Робота ґрунтується на значному за обсягом експериментальному матеріалі, виконана на сучасному науковому та методичному рівні. Отримані дисертантом результати доповнюють і поглиблюють уявлення про початкові етапи метаболізму глутатіону у метилотрофних дріжджів, а також вказують на ймовірні шляхи детоксикації таких токсичних сполук як електрофільні ксенобіотики та іони кадмію у дріжджів *H. polymorpha*. Висновки обґрунтовані достовірним експериментальним матеріалом і статистичною обробкою результатів.

В роботі отримано ряд принципово нових наукових результатів. Зокрема, ідентифіковано і з'ясовано роль генів *GSH1/MET1* і *GGT1* в початкових етапах метаболізму глутатіону та його попередника, цистеїну; досліджено участь цих генів та генів *GSH2* і *MET4* у захисті від електрофільного і/або кадмієвого стресу у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*.

Клоновано ген *GSH1/MET1* *H. polymorpha*, який виявився гомологом гена *MET1* *S. cerevisiae*, що кодує S-аденозил-L-метіонін уропорфіриноген (III) трансметилазу. Показано, що білок HpGsh1p/Met1p та такі джерела сірки як іони сульфату, цистеїн чи GSH не впливають на активність γ -глутамілцистеїнсинтетази

(γ GCS). Ідентифіковано ген *GGT1* *H. polymorpha*, що кодує γ -глутамілтрансферазу (γ GT). З'ясовано, що γ GT не ініціює деградацію GSH як екзогенного джерела сірки у *H. polymorpha*, проте показано, що вона залучена у деградацію кон'югатів GSH з електрофільними ксенобіотиками. Показано, що глутатіон є основним хелатором іонів кадмію у цих дріжджів. З'ясовано, що акумуляція іонів кадмію у *H. polymorpha* є енергозалежним процесом. Запропоновано загальну схему детоксикації кадмію та електрофільних ксенобіотиків у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*.

Практичне значення одержаних результатів.

Робота має значне практичне значення. Генетична лінія DL-1 дріжджів *H. polymorpha* з найкращим вихідним потенціалом для продукції глутатіону може бути використана як селективний матеріал для створення на її основі штамів-надсинтетиків глутатіону. Штами *H. polymorpha* з підвищеною сорбцією іонів кадмію можуть в перспективі бути використані як потенційні кандидати для мікробіологічної ремедіації стоків, забруднених сполуками кадмію.

Результати дисертаційної роботи можуть бути використані у навчальних закладах України різного профілю під час підготовки фахівців з генетики, мікробіології та біотехнології.

Особистий внесок здобувача

Викладені в дисертації результати було отримано автором особисто або за безпосередньої її участі.

Повнота викладу результатів у наукових публікаціях.

За матеріалами дисертації опубліковано 6 статей у фахових наукових журналах та 10 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних наукових конференцій і з'їздів.

Структура дисертації

Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів досліджень, підсумків, висновків, списку використаних джерел, що охоплює 266

найменувань, та додатку. Роботу викладено на 184 сторінках і проілюстровано 49 рисунками та 14 таблицями.

У роботі чітко сформульовано мету і завдання дослідження. Матеріали і методи дослідження – сучасні й адекватні завданням дослідження. Висновки відповідають поставленій меті і завданням.

Окремі дискусійні питання і зауваження до дисертації.

Опонент не має принципових зауважень до роботи. Декілька запитань для дискусії та зауважень технічного характеру наведено нижче:

1. Чим обумовлений вибір старої назви дріжджів *H. polymorpha*, якщо у Вступі подається їх нова назва *Ogataea polymorpha*?

2. У разі наведення посилання на метод, опублікований раніше, краще б було дуже коротко описати, в чому він полягав, це б покращило швидкість аналізу матеріалу (наприклад, стор. 55, 56).

3. Одержані у роботі трансформанти *H. polymorpha pG1*, *pG1-47* та *pG1-36* не змогли досягти показників дикого типу у рівні клітинного GSH+GSSG (за умов з кадмієм і без) (рис.3.3), проте резистентність до дії кадмію у цих трансформантів була навіть вищою, ніж у дикого типу (табл. 3.2). Чим це можна пояснити?

4. В роботі вказано, що ген гомологічний клонованому гену *GSH1/MET1 H. polymorpha* присутній в прокариот та низці нижчих еукаріот, однак нема жодної інформації про поширення цього гена у вищих еукаріот. Чи є гомологи цього гена у рослин та ссавців?

5. Чим можна пояснити, що делеційний мутант *gsh2 ade11* з повною делецією гену γ -глутамілцистеїнсинтетази, проявляв достовірну залишкову активність цього ферменту за умов росту в присутності глутатіону (табл. 3.5)?

6. В роботі практично нема орфографічних помилок, проте є вирази з «наукового жаргону», наприклад, «вірулентний фактор», який, можливо, означає «фактор вірулентності».

7. На мою думку перелік використаних скорочень, поданий автором, є занадто довгим і складає три сторінки. Можливо не варто було вносити в нього загальновідомі скорочення, такі як ДНК, РНК, т.п.н., а.з. та ін.

Однак, всі зазначені питання не зменшують цінності роботи і не впливають на загальну її позитивну оцінку. Проблема, яку досліджує автор дисертації, надзвичайно важлива, а одержані в роботі дані роблять вагомий внесок в розуміння функції генів, залучених в початкових етапах метаболізму глутатіону у метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha*, і мають важливе фундаментальне і практичне значення.

Висновок:

Враховуючи все вищесказане, вважаю, що дисертаційна робота Блаженко О.В. присвячена важливій науковій і практичній проблемі, представляє собою завершену наукову працю, що за актуальністю проблеми, теоретичним рівнем, методичним забезпеченням, науковою новизною та практичним значенням результатів досліджень відповідає вимогам, які ставить ДАК України до кандидатських дисертацій, а її автор Блаженко Олександра Василівна заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Заступник директора з наукової роботи

Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України,

доктор біологічних наук,

старший науковий співробітник

Колибо Д.В.

Підпис *Колибо Д.В.*
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
національної академії наук України
"12" 10 2015 р.

