

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Блаженко Олександрі Василівни “Роль генів початкових етапів метаболізму глутатіону у захисті від стресу у метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha*”, що подано на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Актуальність теми дисертації. Дисертаційну роботу Блаженко О.В. присвячено з'ясуванню молекулярних механізмів вихідних кроків метаболізму глутатіону та його ролі у відповіді клітин дріжджів на кадмієвий стрес. Як об'єкт досліджень обрано неконвенційні дріжджі *Hansenula polymorpha*, що пояснюється існуванням генетичного інструментарію для цього штаму та його практичною цінністю – як господаря для експресії білків, і як знаряддя біоремедіації. Тема роботи актуальна як з фундаментальної так і практичної точок зору, враховуючи, що глутатіон (GSH) є основним компонентом загальної стресової відповіді майже у всіх живих організмах, зокрема і людини.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Робота дисертанта була частиною фундаментальних досліджень відділу молекулярної генетики і біотехнології Інституту біології клітини НАН України за темами «Молекулярні механізми регуляції гомеостазу пероксисом, біосинтезу флавінів і гетерологічних білків та захисту від стресу у неконвенційних дріжджів» (№ держреєстрації 0102V000613, Шифр теми 2.2.9.13, 2002-2005 рр.), «Молекулярні механізми клітинної сигналізації гомеостазу пероксисом, синтезу флавінів, етанолу та глутатіону у дріжджів» (№ держреєстрації 0106U002600, Шифр теми 2.28.2.6., 2006-2010 рр.), білатерального українсько-корейського проекту за темою «Створення рекомбінантних дріжджових штамів для детоксикації важких металів у сточних водах та їх використання в якості біосенсорів» (№ держреєстрації 0103U002338, 01.2003-12.2003 рр.), а також міжнародних проектів INTAS № 2002-0583 «Генетичний аналіз різних шляхів у *H. polymorpha* через мутації і функціональний скрінінг генів, залучених у метаболізмі метанолу, гомеостазі пероксисом, глікозилюванні білків, цілісності клітинної стінки і секреції» (2002-2004 рр.) та Collaborative NATO Linkage Grant LST.CLG 979872 «Генетичний контроль метаболізму глутатіону у метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha*» (2004-2005 рр.). Автор дисертаційної роботи є одним із виконавців вищеназваних досліджень.

Новизна дослідження. До початку досліджень здобувача не існувало даних про генетичний контроль метаболізму глутатіону в *H. polymorpha*. Роль глутатіону в стійкості до кадмієвого стресу також залишалась невивченою. Здобувачем уперше клоновано,

секвеновано і досліджено функції низки генів, що контролюють перші кроки синтезу глутатіону. Також, вперше у дріжджів показано, що гамма-глутаміл-синтетаза бере участь у деградації кон'югатів глутатіону з електрофільними ксенобіотиками. Вперше у *H. polymorpha* з'ясовано, що утилізація глутатіону, як екзогенного джерела сірки, не залежить від гамма-глутаміл-синтетази. Вперше у *H. polymorpha* показано, що активність γ GT регулюється джерелами азоту та сірки. За новизною досліджень робота повністю відповідає вимогам ДАК.

Теоретичне значення результатів досліджень. Біологічний синтез сполук-компонентів антиоксидантного захисту – важлива частина фізіології усіх форм життя, і в різних таксонах цей біосинтез має суттєві відмінності. В абсолютній більшості випадків основним елементом такого захисту виступає трипептид глутатіон. Ця сполука продукується і об'єктом дослідження – *H. polymorpha*. Слід зазначити, що цей вид виявляє низку цікавих властивостей, як от термотолерантність, висока стійкість до низки металів, високий рівень гетеро логічної продукції білка. Результати здобувача дають змогу глибше зрозуміти, який внесок у вищезазначені ознаки робить метаболізм глутатіону. Також, враховуючи евкаріотичне походження *H. polymorpha*, отримані результати можна використовувати у порівняльному аналізі гомологічних генів ссавців, зокрема людини.

Практичне значення результатів досліджень. Висновки, що впливають із результатів роботи, відпрацьовані методи і рекомендації можуть бути застосовані до широкого кола промислових дріжджів. Дисертантом також отримано нові штами з підвищеною продукцією глутатіону та сорбцією іонів кадмію. Ці штами надалі можна використати з практичною метою - наприклад, для промислового виробництва глутатіону, чи як вихідний матеріал для подальших кроків селекції штамів-надпродуцентів.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертація є цілісним дослідженням, її мета і завдання чітко сформульовано. Блаженко О.В. застосувала у своїй роботі сучасні методи генетики, генетичної інженерії, молекулярної біології та біохімії. Положення, сформульовані в роботі, проілюстровані великою кількістю таблиць і рисунків (49 рисунків й 14 таблиць). Список літератури включає 266 посилань. Матеріали дисертації викладено на 184 сторінках за усталеною схемою. Частина технічної і допоміжної інформації винесена автором у додатки, тому дисертаційна робота читається без особливих труднощів. 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

впливають 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.

Матеріали дисертації сповна відображено у публікаціях та в авторефераті. За темою дисертаційної роботи опубліковано 6 статей у фахових наукових журналах (усі – у виданнях, що входять до наукометричних баз даних SCOPUS та Web of Science) та 10 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних наукових конференцій і з'їздів. Здобувач доповіла матеріали дисертаційної роботи на багатьох міжнародних та вітчизняних наукових конференціях, з'їздах.

Зауваження щодо дисертації:

1. Зміст (стор.4); підрозділ 3.1 присвячено, судячи із заголовка, геніві *GSH1*, однак далі є підпункт 3.1.4, який присвячено нокауту *GSH2* – хоча цьому гену (точніше, його промотору) відведено наступний підрозділ.
2. Дискусійним вважаю термін “елементарна сірка” (стор. 15). Мабуть, доречніше вживати поняття “елементна сірка”. Автор вочевидь має на увазі утилізацію сірки у вигляді чистого елемента – це елементна сірка, однак вона вкрай рідко в природі існує і споживається в елементарному вигляді (як окремий атом сульфуру). Переважно це полімер, з яких найпоширенішим є октетна сірка S_8 .
3. Стор.74, рис. 3.7. Не пояснено, що означають величини на кладах дерева амінокислотних послідовностей. Під кладами вказано величини достовірності топології кожної клади, але ні в підписі до рисунку, ані у Методах не пояснено принцип обчислення.
4. У деяких місцях, напр. стор.75, автор зловживає лабораторним жаргоном – “вищеплення фрагмента *Bam*HI/*Bam*HI з плазміді рYT1+5,3 т.п.н. з наступним її самолігуванням...”. Також, не зовсім зрозумілим є аббревіатура Fe-S білки (стор. 17). Очевидно, автор має на увазі, білки, що містять Fe-S-кластери.
5. Можливо, варто ширше обговорити цікаві знахідки роботи. Мова у першу чергу про ті випадки, де активність певних білків *H. polymorpha* не регулюється як у *S. cerevisiae*.
6. У деяких випадках автор вдруге цитує таблицю чи рисунок не як (див табл.), а як (табл.).

Наведені зауваження жодним чином не впливають на загальну високу оцінку розглянутої роботи.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційних досліджень в практиці.

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

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук. Виходячи з вищенаведеної оцінки, вважаю, що дисертація Блаженко Олександрі Василівни “Роль генів початкових етапів метаболізму глутатіону у захисті від стресу у метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha*” є завершеним актуальним дослідженням і містить низку важливих фундаментальних наукових і практичних результатів. За актуальністю, науковою новизною і практичним значенням дисертаційна робота відповідає вимогам п. 11, 12 Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 №567, а її автор Блаженко О.В. заслуговує присудження вченого ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Доктор біологічних наук,
професор кафедри генетики та біотехнології
Львівського національного університету
імені Івана Франка



Б.О. Остап

Підпис Б.О. Остапа засвідчую:
вчений секретар ЛНУ імені І. Франка, доц.



О.С. Грабовецька