В І Д Г У К

офіційного опонента на дисертаційну роботу Стасика Олега Володимировича на тему «Молекулярні механізми вуглецевої катаболітної регуляції та гомеостазу пероксисом у метилотрофних дріжджів», подану на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія.

Актуальність теми дисертації.

Вивчення молекулярних механізмів регуляції метаболізму і гомеостазу клітинних органел за різних умов існування клітини – це один з головних напрямків сучасної клітинної біології.Серед найважливіших глобальних механізмів, задіяних у регуляції генної експресіївелику увагу привертає карбонова катаболітна регуляція. Біогенез і деградація органел - складові численних механізмів клітинної диференціації, адаптації клітин до змін умов існуванняі підтримання клітинного гомеостазу. Дані літератури свідчать, що автофагія задіяна в процесах морфогенезу, апоптозу, канцерогенезу, імунної відповіді на патогени, реакціях клітин на стреси. Зміни автофагійної активності є причиною деяких патологій людини. Необхідною частиною таких досліджень є ідентифікація і вивчення генів, що контролюють механізми біогенезу і деградації органел. Ці гени досить консервативні й виявлені в багатьох різних еукаріотичних організмів. Тому важливим є пошук простих і зручних моделей для вивчення механізмів, що підтримують гомеостаз органел. Цією моделлю є дріжджі та такі процеси як біогенез і деградація пероксисом у цих організмів.

Виходячи з вищезазначеного, тема дисертаційної роботи О.В. Стасика, метою якої є ідентифікація і функціональний аналіз молекулярних механізмів карбонової катаболітної репресії, біогенезу пероксисом та їх автофагійної деградації (пексофагії) у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* і *P. pastoris,* а також вдосконалення системи експресії власних і гетерологічних білків на основі мутантних штамів дріжджів з пошкодженою катаболітною регуляцією чи біогенезом пероксисом, є актуальною і має важливе теоретичне і практичне значення.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Дисертаційна робота О.В. Стасика виконана у рамках наукової тематики відділу молекулярної генетики та біотехнології Інституту біології клітини НАНУкраїни, зокрема, за темою «Молекулярні механізми регуляції гомеостазу пероксисом, біосинтезу флавінів і гетерологічних білків та захисту від стресу у неконвенційних дріжджів» (№ держреєстрації 0102U000613, Шифр теми 2.2.9.13, 2002-2005 рр.). Окремі розділи дисертаційної роботи виконувались у рамках міжнародних проектів INTAS

Європейського співтовариствaINTAS-0015 «Селективна деградація пероксисом у дріжджів» (1996-1998), INTAS-0788 «Принципи біогенезу та деградації пероксисом у дріжджів» (2001-2003) та INTAS-0583 «Генетичний аналіз метаболічних шляхів *H. polymorpha* та функціональний аналіз генів, задіяних у метаболізмі метанолу, гомеостазі пероксисом, глікозилюванні білків, підтриманні цілісності клітинної стінки та секреції» (2002-2004); Двох грантів FIRCA (США): R03 TW00547 «Біогенез та деградація пероксисом у метилотрофних дріжджів *P. pastoris*» та 2R03 TW00547-04A2 «Селективна автофагічна деградація пероксисом у дріжджів» (2001-2004); а також проекту CRDFUB1-2447-LV-02 (США) «Автофагійна деградація пероксисом у дріжджів» (2002-2004).

Новизна дослідження та теоретичне значення результатів досліджень. У дисертаційній роботі О.В. Стасика отримано нові результати, які мають важливе значення для розуміння механізмів карбонової катаболітної регуляції, біогенезу та деградації перокисом у метилотрофних дріжджів. Уперше ідентифіковано та охарактеризовано низку генів *P. pastoris* (*VPS15, PDG1/PEX36, PDG2/ATG28, PDG3/ATG26, ATG35*) та *H. polymorpha* (*HXS1, MIG1, MIG2, HAP4A, HAP4B, ATG26, PEX36*), задіяних у цих процесах. Проведений автором всебічний генетичний та біохімічний аналіз мутантів з порушеннями цих генів дав змогу встановити функцію їхніх білкових продуктів. Автор ідентифікував і функціонально охарактеризував у *H. polymorpha* декілька нових гомологів-транспортерів гексоз, що задіяні у транспортуванні глюкози: *HpHXS1* – гена сенсора глюкози, регулятора позитивного типу, який, у відповідь на наявність глюкози у середовищі, індукує експресію іншого виявленого автором гена транспортера глюкози – *HXT1*; *HpGcr1* – гена транспортера глюкози, який, очевидно, функціонує і як її рецептор (трансцептора). Розроблено новий метод позитивної селекції за допомогою функціональної комплементації з використанням алілового спирту як селективного агенту для клонування *pdg*-генів, які контролюють пексофагію у метилотрофних дріжджів. Виявлено кілька нових генів, а саме *VPS15, ATG26ATG28* та *ATG35*, продукти яких задіяні на різних стадіях пексофагії. Аналіз мутантів за *pdg*-генами (*PDG1/PEX36, PDG3/ATG26*) показав, що у *P. pastoris* і *H. polymorpha* вони задіяні лише у пексофагії, але не в загальній автофагії. Доведено, що продукт гена *ATG26* – ергостерол глюкозилтрансфераза, вибірково задіяна у мікро-та макропексофагії*P. pastoris* і *H. polymorpha*, а продукт гена *P. pastoris ATG28* є компонентом апарату автофагії, відповідальним за селективне розпізнавання пероксисом, що у комплексі з білком-продуктом гена *ATG35* пов’язує механізми загальної автофагії та селективної пексофагії. Уперше встановлено, що у процесах пексофагії та загальної автофагії у *P. pastoris* задіяний гомолог *VPS15S. cerevisiae* та *P150 Homo sapiens*, які регулюють перенесення вакуолярних ферментів у цих організмів. Запропоновано гіпотезу про роль комплексу Vps15/Vps34 у формуванні мембранних везикулярних структур, пов'язаних з

процесами автофагії. Виявлено і охарактеризовано функціональні ділянки мембранного білка пероксисом*P. pastoris* Pdg1, відповідальні за різні функції регуляції гомеостазу пероксисом. На моделі pdg1 вперше виявлено явище селективного видалення пероксину з мембран пероксисом та його повторного використання під час пексофагії.

Результати дисертаційної роботи О.В. Стасика є вагомим внеском у вивчення механізмів і генетичного контролю гомеостазу пероксисом і катаболітної регуляції у метилотрофних дріжджів. За такими критеріями як новизна та теоретичне значення досліджень дисертаційна робота О.В. Стасика повністю відповідає вимогам ДАК.

Практичне значення результатів досліджень. Як самі механізми карбонової катаболітної регуляції та гомеостазу пероксисом, так і штами *H. polymorpha*та *P. pastoris*, які досліджені у дисертаційній роботі О.В. Стасика, маютьвелике практичне значення і привертають постійну увагу мікробіологів, генетиків та біотехнологів, що використовують метилотрофні дріжджі у промисловому виробництві. Тому результати, отримані дисертантом, сприяють глибшому розумінню біології цих об'єктів промислової мікробіології в цілому, і, отже, й значно ефективнішому практичному використанню цих процесів і продуцентів. Використовуючи отримані в ході виконання роботи дані та опрацьовані методичні підходи дисертант розробив систему експресії рекомбінантних білків на основі мутантних штамів із пошкодженою карбоновою катаболітною регуляцією чи гомеостазом пероксисом і сконструював рекомбінантні штами-продуценти низки дріжджових і гетерологічних білків, які мають медичне і біотехнологічне значення (алкогольоксидази, поверхневого антигена вірусу гепатиту В, людського проінсуліну, глюкозооксидази тощо).Створена модифікована платформа для експресії білків не передбачає використання токсичного і вогненебезпечного метанолу для індукування ферментації і має переваги для біотехнологічного застосування.

Значним здобутком роботи є те, що у ході її виконання дисертант опрацював нові методичні підходів, такі, як, наприклад, система мультикопійної інтеграції рекомбінантних ДНК в геном *H. pylomorpha*, яка ґрунтується на нових маркерних генах *ADE1* і *FLD1* і не передбачає використання антибіотиків як селективних агентів для відбору і підтримання стабільності клонів клітин, що несуть рекомбінантні ДНК. Автор сконструював низку рекомбінантних штамів і плазмід, які можуть бути використані в дальших дослідженнях метилотрофних дріжджів. Опрацьовані автором методичні підходи можуть бути застосовані й до інших видів і штамів дріжджів.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.Дисертація є цілісним, закінченим дослідженням. Мета і задачі роботи сформульовані чітко та коректно.В огляді літератури висвітлено значення метилотрофних дріжджів

уфундаментальних та прикладних дослідженнях, розглянуто і проаналізовано сучаснідані про функції, біогенез і деградацію пероксисом, механізмикарбонової катаболітної регуляції та процесів, які забезпечують гомеостаз органел у дріжджів, роль катаболітної регуляції у біогенезі і деградації пероксисом у метилотрофних дріжджів, висвітлено сучасні підходи до вивчення цих процесів, досягнення і проблеми цього напряму досліджень. Список літератури включає 492 посилання. Цілком обґрунтованим є й вибір штамів мікроорганізмів, які використовувалися в дисертаційній роботі. У дисертаційній роботі О.В. Стасика використано метилотрофні дріжджі *Hansenula* (*Ogataea*) *polymorpha* і *Pichia* (*Komagataella*) *pastoris для яких* добре опрацьовані методи клітинної біології, генетики та генетичної інженерії, а їхні геномисеквеновані. Крім того, це промислові мікроорганізми, які використовуються, зокрема, для продукції медично важливих гетерологічних білків. Важливою перевагою моделі, використаної в дисертаційній робот, є те, що синтез ферментів утилізації метанолу, а також біогенез пероксисом – органел, необхідних для метилотрофного росту, підлягає репресії глюкозою, іншими цукрами та етанолом. За присутності у середовищі глюкози та етанолу індукується автофагійна деградація пероксисом. Отже, процеси формування і деградації пероксисом можна контролювати, додаючи у середовище певні джерела карбону.Вирішуючи поставлені завдання, дисертант застосував комплекс сучасних методів клітинної біології, генетики, генетичної інженерії, біохімії дріжджів і біоінформатики. Дисертацію викладено на 424 сторінках тексту і проілюстровано 121 рисунком і 17 таблицями. Результати, отримані автором, опрацьовано статистично та детально обговорено з врахуванням існуючих даних літератури. Виклад матеріалу відповідає поставленій меті та завданням дисертаційної роботи. Висновки, зроблені здобувачем, аргументовані та узагальнюють отримані результати. Тому достовірність положень та висновків, сформульованих у дисертації, не викликає сумніву.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях.

Матеріали дисертації сповна викладені у публікаціях автора. За темою дисертаційної роботи О.В. Стасик опублікував 27 статей (з них 19 – у міжнародних виданнях, сумарний імпакт-фактор яких становить 67, і 8 у вітчизняних фахових виданнях), 1 розділ у монографії, отримав, 1 патент США і 1 патент України на корисну модель, представив 49 доповідей на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях і з'їздах.

Зауваження до тексту дисертації та автореферату.

1. У розділі дисертації «Узагальнення експериментальних результатів» і в авторефераті, автор не навів схеми (схем), які б підсумовували сучасний стан вивчення проблем, досліджуваних в дисертації, в якихбуло б позначено гени/білки (явища), виявлені і вивчені автором, що сприяло б кращому узагальненню результатів і обґрунтуванню висновків дисертації, а також об'єктивній оцінці внеску автора.

2. Практичне значення одержаних результатів у розділі «Загальна характеристика роботи» висвітлено недостатньо. Практично важливі результати роботи зосереджені головно в розділі 3.5. «Біотехнологічне застосування мутантних штамів дріжджів з порушенням глюкозної регуляції і гомеостазу пероксисом» (займає 42 сторінки тексту). Однак, в авторефераті йому присвячено лише трохи більше половини сторінки і в тексті автореферату не конкретизовано в чому полягає новизна і ефективність системи мультикопійної інтеграції векторів експресії у геном *H. polymorpha*, з яких елементів складається модифікована платформа експресії білків, не подано конкретних даних про рівень експресії рекомбінантних білків і порівняння з раніше опрацьованими системами експресії на основі метилотрофних дріжджів.

3. Висновок 9 не випливає власне з результатів цієї роботи, це скоріше так зване «загальне місце, *locuscommunis*», з яким важко не погодитися і який стосується будь-яких сучасних досліджень у галузі клітинної біології і генетики.

4. В анотації до дисертації слід було приділити більшу увагу викладу і узагальненню власних результатів дисертанта.

5. На частині рисунків (наприклад 3.2.2, 3.3.2, 3.3.9, 3.3.21, 3.4.5) не відображено даних статистичної обробки представлених результатів.

6. У дисертації зустрічаються невдалі та занадто складно побудовані речення, невиправлені граматичні помилки.

Зазначені недоліки стосуються головно оформлення дисертації та не знижують її загальної високої позитивної оцінки.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційних досліджень в практиці. Отримані автором теоретичні результати щодо процесів біогенезу і деградації перокисом, будови і функцій виявлених генів, закономірностей регуляторних механізмів, опрацьовані методичні підходи, а також сконструйовані в ході роботи штами та рекомбінантні молекули ДНК можуть бути використані у наукових закладах, де вивчають біологію дріжджів, зокрема метилотрофних, а також біотехнологічних підприємствах, які займаються культивуванням дріжджів. Їх можна використати в навчальних закладах України під час підготовки фахівців з клітинної біології, мікробіології, генетики і біотехнології.

Висновок про відповідність дисертації вимогам Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника. Вважаю, що докторська дисертація «Молекулярні механізми вуглецевоїкаталітної регуляції та гомеостазу пероксисом у метилотрофнихдріжджів» за актуальністю, науковою новизною і практичним значенням,високим методичним рівнем проведених досліджень, широким висвітленням їх у публікаціях і матеріалах наукових конференцій і з'їздів, відповідає вимогам п. 10, 12 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника»,

співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 № 567, а її автор, Стасик Олег Володимирович, заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю – 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія.

3 червня 2019 року

Завідувач кафедри генетики та біотехнології
Львівського національного університету
імені Івана Франка,
доктор біологічних наук, професор Федоренко В.О.

Підпис Федоренка В.О. засвідчую

Вчений секретар Львівського національного
університету імені Івана Франка, доцент Грабовецька О.С.