

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Стасика Олега Володимировича «**Молекулярні механізми вуглецевої катаболітної регуляції та гомеостазу пероксисом у метилотрофних дріжджів**», представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00. 11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

**Актуальність дисертаційної роботи** Стасика Олега Володимировича обґрунтована фундаментальним та практичним значенням дослідження молекулярних сигнальних механізмів катаболітної регуляції метаболізму, експресії генів та гомеостазу органел еукаріотичної клітини як проблеми сучасної клітинної, молекулярної біології та мікробіології.

Дисертант поставив **за мету** своєї роботи «ідентифікацію та функціональний аналіз молекулярних компонентів механізмів карбонової катаболітної репресії, біогенезу пероксисом та їх автофагійної деградації (пексофагії) у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* та *P. pastoris*, та їх порівняльний аналіз із аналогами у пекарських та інших дріжджів». Окрім цього метою було «вдосконалити систему експресії власних та гетерологічних білків на основі мутантних штамів дріжджів з пошкодженою катаболітною репресією чи біогенезом пероксисом»

**Об'єктом дослідження** дисертант визначив «явища та молекулярні механізми карбонової катаболітної регуляції експресії генів та регуляції гомеостазу (біогенезу та деградації) пероксисом у метилотрофних дріжджів».

**Предметом дослідження** визначено нові гени та їх білкові продукти, задіяні у катаболітній регуляції пероксисом, мутантні штами метилотрофних дріжджів з пошкодженими відповідними механізмами, зокрема з делетованими генами транспортерів гексоз, що можуть виконувати сенсорну функцію; з делетованими генами гомологів транскрипційних факторів; з пошкодженою селективною деградацією пероксисом чи їх біогенезом; штами метилотрофних дріжджів – продуценти гетерологічних білків.

**Наукова новизна отриманих результатів** не викликає сумнівів, основні позиції викладені стисло і чітко. Так, дисертантом уперше ідентифіковано компоненти транспортної системи гексоз у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*, задіяні у механізмі транскрипційної індукції та репресії у відповідь на зміни рівня позаклітинної глюкози. Встановлено, що транспорт глюкози є важливим, але не єдиним чинником, що визначає ефективність глюкозної репресії. Підтверджено, що нетранспортуючий сенсор гексоз Hxs1 (Hexose sensor) не бере участь у механізмах глюкозної репресії чи інактивації, але є необхідним для індукції функціонального транспортера Hxt1 (Hexose transporter). Запропоновано, що білок *H. polymorpha* Gcr1 (Glucose catabolite repression) є представником нового типу тра-

нспортуючого рецептора (трансцептора), унікальним для *H. polymorpha* та близькоспоріднених дріжджів. Показано, що компоненти механізму глюкозної репресії у дріжджів *S. cerevisiae*, Mig1/2 не є необхідними для відповідного механізму у Вперше на моделі дріжджів встановлено, що комплекс кіназ Vps15/Vps34 є необхідним для механізму загальної автофагії. Розроблено новий ефективний метод позитивної селекції та клонування *ATG* генів у *P. pastoris* з використанням алілового спирту при функціональній комплементатії відповідних мутантів банком генів. Вперше ідентифіковано ряд нових генів метилотрофних дріжджів, задіяних у механізмі селективної деградації пероксисом (пексофагії), але не загальної автофагії у відповідь на голодування за джерелом Нітрогену (Atg26, Atg28, Atg35). Ідентифіковано новий унікальний білок пероксисомних мембран (пероксин) Pex36 у метилотрофних дріжджів, задіяний у регуляції біогенезу та деградації пероксисом.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблено нову ефективну систему для мультикопійної інтеграції векторів у геном штамів-продуцентів без використання генів резистентності до антибіотиків. На моделях ряду рекомбінантних білків та мутантів з пошкодженою глюкозною репресією підтверджено можливість їх двохфазної продукції на субстратах цукрах без використання метанолу.

**Опублікування результатів дисертації.** Матеріали дисертації в повній мірі відображені та опубліковані дисертантом у 79 наукових працях, включаючи 27 статей у фахових виданнях, з них 19 – у закордонних, із сумарним імпаکت фактором – 67 та 8 – у вітчизняних виданнях; 1 розділ у міжнародній монографії, 2 патенти (1 – патент США та 1 – патент України на корисну модель), 49 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях.

**Апробація результатів дисертації.** Результати роботи доповідались здобувачем на численних вітчизняних та міжнародних конференціях: I Конгресі Українського товариства клітинної біології (Львів, Україна, 2004), Міжнародній науковій конференції «Сенсинг поживних сполук плазматичною мембраною еукаріотичних клітин» (Сіренцестер, Великобританія, 2004), XII Міжнародному дріжджовому конгресі «Дріжджі для прогресу людства» (Київ, 2008), XXVII Міжнародному спеціалізованому дріжджовому симпозиумі (Париж, Франція, 2009), II, IV та V Польсько-Українській Вайглівській мікробіологічній конференції (Варшава, Польща, 2007, Вроцлав, Польща, 2011 та Чернівці, Україна, 2013), I міжнародному симпозиумі «Неконвенційні дріжджі у постгеномну еру» (Львів, Україна, 2011), III з'їзді Українського товариства клітинної біології (Ялта, Україна, 2012), IV з'їзді Українського товариства клітинної біології (Ужгород, Україна, 2014), Міжнародній конференції по неконвенційних дріжджах NSY-2018

(Жешів, Польща, 2018), Міжнародній конференції «Досягнення мікробіології та біотехнології» (Львів, Україна, 2018) та інших. (Rzeszow, Poland, 2018) та інших.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація містить наступні розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати досліджень та їх обговорення», «Узагальнення результатів досліджень», «Висновки», «Список використаних джерел», Додатки. Дисертацію викладено на 424 сторінках, із них основна частина займає 280 сторінок. Робота містить 121 рисунок, 17 таблиць і 492 джерела літератури.

**У розділі 1. «Огляд літератури»** викладено аналіз сучасних даних про сенсинг глюкози та пов'язану транскрипційну регуляцію у дріжджів, включаючи опис Snf3/Rgt2-залежного шляху транскрипційної індукції, Mig1-Hxk2-Snf1 шляху глюкозної репресії, Grp1-cAMP/РКА шляху регуляції метаболізму. Висвітлено механізми, пов'язані із фізіологічними функціями, біосинтезом, та селективною деградацією пероксисом, а також значенням метилотрофних дріжджів як об'єктів у фундаментальних та прикладних дослідженнях. На основі огляду наукової літератури обґрунтовано необхідність проведення досліджень за темою дисертації. В цілому цей розділ демонструє дуже добре володіння дисертантом сучасними даними міжнародної літератури з обраної теми дисертації.

**У розділі 2. «Матеріали і методи»** достатньо детально описано широкий спектр застосованих у роботі класичних та сучасних методів генетичних, біохімічних, мікробіологічних, мікроскопічних досліджень та методів клітинної біології. Для конструювання рекомбінантних векторів використано різноманітні молекулярно-біологічні методи маніпуляцій з ДНК і генетичної трансформації бактерій та дріжджів. Для аналізу мутантних штамів дріжджів та продуцентів рекомбінантних білків використано метод ПЛР-аналізу та гібридизації ДНК за Саузерном. Експресію генів досліджували методами ПЛР у реальному часі, склад білків аналізували методом Вестерн-блот аналізу. Визначалась активність ряду ферментів у безклітинних екстрактах та колоніях дріжджів. Застосовувались методи спектрофотометрії для моніторингу культур мікробних об'єктів. Для клітинно-біологічних досліджень застосовували сучасні методи флуоресцентної та електронної мікроскопії. У роботі широко використовувались методи комп'ютерного аналізу послідовностей генів та білків, та баз даних геномів дріжджів та інших організмів.

**Характеристика Розділу 3. «Результати досліджень та їх обговорення»**

**Підрозділ 3.1. Дослідження ролі компонентів системи транспорту глюкози в механізмах глюкозного сигналювання та катаболітної регуляції у *H. polymorpha***

У цьому підрозділі описано наступні дослідження:

- Ідентифікацію та аналіз амінокислотних послідовностей білкових продуктів нових генів *HXS1* та *HXT1* та їх порівняння з базами даних.
- Сконструювано штами з делеціями у генах *HXS1* та *HXT1*, а також штаму *Δgcr1Δhxs1* з делеціями обох генів та проведено аналіз їх фенотипів.
- Проаналізовано ефект надекспресії генів *HXS1*, *GCR1* та *HXT1* у *S. cerevisiae hxt null* мутанта, дефіцитного за транспортом гексоз.
- Досліджено роль цитозольного С-кінцевого фрагмента Hxs1 у глюкозному сигналюванні.
- Сконструювано специфічні мутантні форми *HXS1* та *GCR1*, які конститутивно передають “глюкозний сигнал”
- Проведено аналіз експресії гомологів транспортерів гексоз та генів-мішеней глюкозної регуляції у мутантів *H. polymorpha*, з пошкодженими гексозними транспортерами чи сенсорами.
- Досліджено вплив мутацій у гомологах транспортерів гексоз на пексофагію у *H. polymorpha*
- Наведено фенотипову характеристику потенційного трансцептора *H. polymorpha Gcr1*.

У підсумку ідентифіковано та функціонально охарактеризовано декілька нових гомологів транспортерів гексоз метилотрофних дріжджів *Hansenula (Ogataea) polymorpha*, які беруть участь у транспорті глюкози, сенсингу та сигналюванні для транскрипційної регуляції, чи в обох процесах. Встановлено, що ген *HpHXS1* (*HeXose Sensor*) кодує “класичний” нетранспортуючий сенсор глюкози, залучений у транскрипційну індукцію іншого ідентифікованого гена, що кодує низькоафінний транспортер гексоз *HpHXT1* (*HeXose Transporter*), у відповідь на присутність гексоз. Подібно до інших дріжджових сенсорів, заміна однієї консервативної амінокислоти в послідовності Hxs1 (R203K) перетворювала білок у конститутивно-активовану сигналюючу форму, а його С-термінальний фрагмент був важливим для його функції. Встановлено, що Hxs1 не є необхідним для сигналювання глюкозної репресії чи пероксофагії.

Інший гомолог транспортерів гексоз у *H. polymorpha*, *HpGcr1*, був раніше ідентифікований як імовірний сенсор чи транспортер, необхідний для глюкозної репресії. У роботі встановлено, що ортолог *HpGcr1* відсутній у геномах більшості дріжджів, за винятком кількох філогенетично пов'язаних із *H. polymorpha* видів, а іншими його найближчими гомологами є високоафінні симпортери глюкози чи ймовірні трансцептори з грибів, що свідчить про можливе походження *HpGcr1* шляхом горизонтального перенесення з грибів *Eurotiales*, або збереження специфічного архаїчного гена. Специфічна амінокислотна заміна *HpGcr1*<sup>R165K</sup> конвертувала сенсор у форму, що не відновлювала транспорт глюкози чи глюко-

зну репресію, але натомість додатково пошкоджувала ріст незалежно від наявного джерела вуглецю. Гетерологічна експресія *HpGcr1* в *hxt*-нуль штамі *S. cerevisiae* не відновлювала транспорт глюкози внаслідок міслокалізації білка. Однак надекспресія *HpGcr1* у *H. polymorpha* призводила до підвищення чутливості такого штаму до низьких концентрацій позаклітинної 2-дезоксиглюкози, що свідчить на користь здатності *HpGcr1* транспортувати глюкозу. Одночасно,  $\Delta gcr1$  виявляв пошкодження транскрипційної індукції пероксисомної алкогольоксидази та метилотрофного росту. Надекспресія функціонального транспортера *HpHxt1* в мутанта  $\Delta gcr1$  частково відновлювала ріст на глюкозі та повністю глюкозну репресію, але не впливала на порушений ріст на метанолі.

Сукупні результати досліджень свідчать, що у Crabtree-негативних дріжджів *H. polymorpha* i) нетранспортуючий сенсор *Hxs1* опосередковує сигналювання у шляху індукції транскрипції гексозної; ii) *HpGcr1* представляє новий тип дріжджового трансцептора глюкози, що функціонує також за її відсутності; iii) ефективність поглинання гексоз є ключовим лімітуючим фактором забезпечення катаболітної репресії.

### **Підрозділ 3.2. Молекулярно-генетичний та функціональний аналіз потенційних гомологів транскрипційних факторів *Mig1*, *Mig2* і *Hap4* у *H. polymorpha*.**

У цьому підрозділі описано наступні дослідження щодо:

- Аналізу амінокислотних послідовностей білкових продуктів генів *MIG1* і *MIG2* та їх порівняння з базами даних.
- Конструювання делеційних штамів по генах *MIG1*, *MIG2*, подвійного мутанта *mig1mig2* та аналізу їх фенотипів.
- Аналізу впливу мутацій *mig1* і *mig2* на механізми катаболітної регуляції у *H. polymorpha*.
- Конструювання делеційних штамів за генами *HAP4-A*, *HAP4-B*, подвійного делеційного мутанта та аналіз їхніх фенотипів.

У цьому розділі дисертаційній роботі вперше встановлено, що пошкодження гомологів репресорів *MIG1*, *MIG2* у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* незначно впливає на індуковану цукрами чи етанолом катаболітну репресію. Також виявлено, що у клітинах подвійного делеційного мутанта *H. polymorpha mig1mig2* спостерігається пошкодження макропексофагії, тоді як мікроавтофагія стає домінантним механізмом деградації пероксисом. Отримана нами дані підтверджують, що гомологи елементів основного шляху репресії *S. cerevisiae* мають у *H. polymorpha* плейотропні та спеціалізовані функції. Таким чином, механізми передачі сигналу глюкози у катаболітній репресії суттєво відрізняється у пекарських і метилотрофних дріжджів.

Також у геномі *H. polymorpha* на основі гомології консервативних ДНК-зв'язуючих доменів ідентифіковано два гіпотетичні ортологи білка Nap4 *S. cerevisiae*, залученого у транскрипційну регуляцію метаболічного балансу між бродінням і диханням, названих *HpNap4-A* і *HpNap4-B*. Аналіз сконструйованих делеційних мутантів по цих генах підтвердив, що *HpNAP4-A* бере участь у контролі балансу дихання/бродіння, тоді як *HpNAP4-B* залучений у відповідь на оксидативний стрес. Окрім цього, *HpNAP4-A* є залученим до глюкозної репресії, але не індукованої глюкозою пексофагії. Ці дані підтверджують, що функція Nap4-подібних транскрипційних регуляторів у *H. polymorpha* є відмінною від встановленої для *S. cerevisiae*.

### **Підрозділ 3.3. Ідентифікація і аналіз молекулярних компонентів селективної деградації перекисом (пексофагії) у метилотрофних дріжджів.**

У цьому підрозділі описано наступні дослідження щодо:

- Клонування і функціонального аналізу у гену *VPS15* дріжджів *P. pastoris* і його білкового продукту.
- Розробки системи з використанням зеленого флуоресцентного білка (GFP) як маркера для вивчення біогенезу та деградації перекисом.
- Розробки методів моніторингу активності алкогольоксидази (АОХ) та пексофагії на чашках Петрі та клонування *ATG* генів у метилотрофних дріжджів
- Виділення колекції мутантів *P. pastoris* з пошкодженою пексофагією (*pdg*) та їх фенотипового та генетичного аналізу.
- Клонування та функціональний аналіз генів *PDG2/ATG28* та *PDG3/ATG26*, задіяних у деградації перекисом.
- Ідентифікації нового білка *Atg35* як взаємодіючого партнера *Atg28* у *P. pastoris*.
- Виділення і характеристики мутанта *H. polymorpha*, дефіцитного за гомологом *Atg26*.
- Селекції етанол-неутилізуючих мутантів *H. polymorpha* та аналізу процесів катаболітної регуляції.

Таким чином, у результаті виконання цього розділу роботи на основі метилотрофних дріжджів *P. pastoris* як зручної моделі було ідентифікували декілька нових генів, заучених у пексофагію, а саме *VPS15*, *ATG26* та *ATG28*. Для клонування генів за допомогою функціональної комплементачії було розроблено ефективну адаптацію методу на основі алілового спирту. Також продукт нового гена *ATG35* був ідентифікований у дріжджовій двогібридній системі як взаємодіючий партнер *Atg28*. Продемонстровано, що продукти генів *ATG26*, *ATG28* та *ATG35* є залучені у першу чергу у механізмі пексофагії, який регулюється заміною джерел вуглецю, але не у неселективній загальній аутофагії, що регулюється голоду-

ванням за нітрогеном. Функціональна спеціалізація та внутрішньоклітинна локалізація відповідних білків засвідчили, що ці компоненти забезпечують розпізнавання автофагійними механізмами та доставку пероксисом до вакуоль у процесі пексофагії. Також було встановлено, що функція Atg26 є консервативною у *H. polymorpha*.

### **Підрозділ 3.4. Виділення та аналіз мутантів *P. pastoris* і *H. polymorpha* із порушеною регуляцією біогенезу та гомеостазу пероксисом.**

У цьому підрозділі описано дослідження, що стосуються:

- Молекулярного клонування гена *PDG1/PEX36* *P. pastoris* і фенотипового аналізу мутантів *pdg1/pex36* *P. pastoris*
- Ідентифікації і характеризації гомолога Pdg1 у *H. polymorpha*.
- Пошуку функціональних гомологів *PpPdg1* у неметилотрофних дріжджів.
- Виділення і аналізу процесів пексофагії в умовних мутантів *pexb* *H. polymorpha*, дефіцитних по біогенезу пероксисом

У результаті виконання цього розділу роботи було ідентифіковано новий білок Pdg1/Pex36 у *P. pastoris* і *H. polymorpha*, як новий мембранний білок пероксисом, який виявляє певну функціональну гомологію до пероксину людини HsPex16 та Pex34 *S. cerevisiae*. Дефекти, спричинені *pex36* мутаціями у *P. pastoris*, можуть бути частково функціонально комплементовані надекспресією Pex16 *Y. lipolytica* або Pex34 *S. cerevisiae*. Показано, що у *P. pastoris*, Pex36 не є білком строго необхідним для проліферації пероксисом, але мутації у відповідному гені блокують їх біогенез, якщо поєднані з мутаціями у гені *PEX25*. Клітини мутанта *pex36* характеризуються частковим дефектом росту у середовищі з метанолом внаслідок порушення транспорту до пероксисом PTS1-, PTS2- та mPTS-залежних білків. Описана роль Pex36 у пексофагії може бути як прямою, так і опосередкованою, внаслідок багаточисельних пертурбацій у спектрі білків-пероксинів, викликаних дефіцитом Pex36. Також пропонується, що у *P. pastoris* Pex36 є об'єктом раніше невідомого ретроградного транспорту мембранних білків пероксисом до ER.

У другій частині цього розділу описано дослідження, метою яких було з'ясувати, чи функція двох взаємодіючі АТФ-аз, Pex1 and Pex6, є необхідною окрім біогенезу пероксисом також для регуляції їх деградації. Мутації у відповідних генах людини є однією із основних причин спадкових захворювань, пов'язаних з порушенням біогенезу пероксисомом. За допомогою УФ-мутагенезу мутанта *pexb* *H. polymorpha*, був виділений умовний чутливий до холоду ревертант з відновленою здатністю до росту на середовищі з метанолом при 37<sup>0</sup>С, але не при 28<sup>0</sup>С. Встановлено точкові мутації у вихідному мутанті та похідному хо-

лодочутливому. Якщо відокремлена від вихідної G737E, вторинна мутація R1000G не впливає на метилотрофний ріст. Запропоновано, що обидві мутації імовірно впливають на внутрішньо- чи міжмолекулярні взаємодії двох AAA доменів АТФаз. Не встановлено безпосереднього впливу аналізованих мутацій на процес пексофагії.

### **Підрозділ 3.5. Біотехнологічне застосування дріжджових мутантних штамів з порушенням глюкозної регуляції і гомеостазу пероксисом.**

У цьому присвяченому біотехнологічному застосуванню мутантів з пошкодженою катаболітною регуляцією підрозділі описано дослідження, щодо:

- Розробки системи мультикопійної інтеграції векторів у геном *H. polymorpha* на основі власних та гетерологічних генетичних маркерів, зокрема клонування та використання біосинтетичного гена *ADE1 P. pastoris* та гена формальдегіддегідрогенази *FLD1 H. polymorpha* як селективних маркерів для мультикопійної інтеграції у *H. polymorpha*.

- Виділення надпродуцентів гетерологічних ферментів на основі мутантів *H. polymorpha*, дефектних за глюкозною регуляцією, на основі розроблених нових методів мультикопійної інтеграції векторів. Зокрема:

- характеристичні мутантні штами *H. polymorpha* як штами-господарі для продукції рекомбінантних білків, таких як секреторної глюкозооксидази *Aspergillus niger*, поверхневого антигена вірусу гепатиту В (HbsAg), та секретованого міні-проінсуліну людини.

- конструювання стабільних надпродуцентів HBsAg другого покоління за допомогою поєднання різних методів мультикопійної інтеграції і дефекту біогенезу пероксисом.

У результаті проведеної роботи було виділено мутантні штами *H. polymorpha* ЕАО (Elevated Alcohol Oxidase), дефектні за глюкозною репресією  $P_{AOX}$  внаслідок порушення гена *HpGCR1*, що кодує потенційний глюкозний трансцептор, та інших неідентифікованих вторинних мутацій. Мутанти виявляли виражені дефекти регуляції  $P_{AOX}$  тільки гексозами і ксилозою, але не дисахаридами або етанолом. На основі одного із таких мутантних штамів-господарів було розроблено модифіковану платформу експресії гетерологічних білків з двома джерелами Карбону, яка використовує зручні субстрати-цукри для росту (сахароза) та індукції експресії рекомбінантного білка (глюкоза або ксилоза). Продемонстровано ефективну, регульовану за допомогою Карбонівих джерел експресію трьох рекомбінантних білків: секреторної глюкозооксидази з гриба *A. niger*, секреторного міні про-інсуліну людини і внутрішньоклітинного поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) в цих мутантних штамів-господарях. Також розроблено нову платформу для мультикопійної інтеграції векторів в геном *H.*



*polymorpha*, що базуються на маркерних генах дріжджів (*ADE1 P. pastoris* і *FLD1 H. polymorpha*) і не використовує потенційно небезпечні гени резистентності до антибіотиків. Запропоновані підходи можуть бути використані для конструювання ефективних продуцентів рекомбінантних білків, що містять контрольовану кількість касет експресії, стабільно інтегрованих в їхні геноми. Окрім цього показано, що делеція гена *PEX3*, що кодує пероксин, залучений на ранній стадії утворення пероксисом, істотно збільшує продукцію HBsAg в ЕАО-господарів порівняно із батьківським штамом. Максимальна досягнута продуктивність синтезу HBsAg у штаму *Δpex3* ЕАО становила близько 8% - 9% загального клітинного білка.

В розділі 4 «Аналіз та узагальнення результатів досліджень» дисертант ґрунтовно обговорює та аналізує отримані дані та пропонує яким чином дослідження у відповідній галузі можуть бути продовжені та розвинені.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, сформульованих у дисертації підтверджені результатами досліджень з використанням значної кількості сучасних молекулярно-біологічних, клітиннобіологічних, мікроскопічних та мікробіологічних методів досліджень, та не викликають сумнівів.

Викладені результати досліджень та сформульовані висновки в цілому не викликають заперечень, але разом з тим є деякі зауваження, більшість з яких носить редакційний характер:

1. Необхідно більш чітко структурувати та виділяти розділи та підрозділи основної частини дисертаційної роботи. Наприклад Розділ 3.2. «Молекулярно-генетичний та функціональний аналіз потенційних гомологів транскрипційних факторів *Mig1*, *Mig2* і *Hap4* у *H. polymorpha*» виглядає так, ніби не містить експериментальної інформації. Якщо це пояснення/обґрунтування наступної інформації, то це слід коректніше диференціювати.
2. У тексті дисертації часто зустрічається термін «пошкодження» стосовно генетичного матеріалу чи процесу, напр. «несе пошкодження у гені-гомологу», чи «потенційно пошкодженою деградацією пероксисом». Це однак загальна назва, яка потребує уточнення, і необхідно наводити більш конкретне визначення характеру пошкодження.
3. Розділ 3.3. Фраза «Внаслідок випадкової присутності ймовірного гомолога *ScVPS15* на векторі з банку генів поряд із раніше клонованим геном *PEX2 P. pastoris*» не зрозуміло, якого саме фрагменту, потрібно роз'яснити.

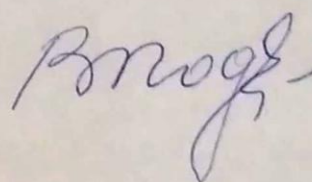
4. Підпис до рис. 3.1.14. «Аналіз ролі сенсора Hxs1 у пексофагії» є невдалим, оскільки аналізується вплив також делецій інших гомологів транспортерів, таких як *GCR1* та *HXT1* на відповідний процес.
5. На рис. 3.1.15 необхідно уточнити, на основі подібності якої саме послідовності – нуклеотидної чи амінокислотної, було побудовано філогенетичну дендрограму.
6. У Розділі 3.2., рис. 3.2.4 вказується «При цьому у вирощених на метанолі клітин *Δmig1Δmig2* також спостерігались додаткові білкові смуги, які свідчать про надлишкову деградацію АОХ у порівнянні із штамом дикого типу». Однак з відповідного рисунку видно, що додаткові білкові смуги, хоча і менш виражені, присутні і в клітинах дикого типу.
7. Розділ 3.3. На підставі 32% ідентичності дисертант стверджує про структурну гомологію білків *PpVps13* та *ScVps15*, однак у попередньому розділі при 26% ідентичності робиться висновок про обмежену гомологію *HpMig1* до *ScMig1*. Чи можуть ці 6% відмінності забезпечувати перехід від «потенційної» гомології до «чіткої» гомології?
8. Розділ 3.4.: необхідно дати чіткіше пояснення, як у подальшому була використана «колекція мутантів *P. pastoris* з пошкодженою пексофагією».
9. Розділи 3.3. та 3.4 Дисертант описує виділення та аналіз відповідників генів *PDG3/ATG26* та *PDG1/PEX36*, клонованих та досліджених у *P. pastoris*, у метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*. Такий аналіз не було проведено для іншого клонованого і охарактеризованого у *P. pastoris* гена *PDG2/ATG28*, чому?
10. У розділі 3.5. наводиться пояснення, що «вторинна мутація в ЕАО2 впливає на глюкозну репресію специфічно у поєднанні з мутацією *gcr1-2*», і що відповідну мутацію не вдалось ідентифікувати функціональною комплементарією, але не чітко пояснено чому?
11. Розділ 3.5. Не пояснено, чому надпродуценти пероксисом ЕАО виділялись на основі точкового мутанта *gcr1-2*, а не стабільного делеційного штаму по відповідному гену.

Наведені зауваження несуть переважно редакційний характер та не є такими, що можуть вплинути на загальну високу оцінку дисертації, яка є завершеною самостійною науковою працею високого міжнародного рівня. Оцінюючи дисертаційну роботу Стасика Олега Володимировича в цілому, слід зазначити, що ним отримано важливі фундаментальні результати щодо молекулярних меха-

Наведені зауваження несуть переважно редакційний характер та не є такими, що можуть вплинути на загальну високу оцінку дисертації, яка є завершеною самостійною науковою працею високого міжнародного рівня. Оцінюючи дисертаційну роботу Стасика Олега Володимировича в цілому, слід зазначити, що ним отримано важливі фундаментальні результати щодо молекулярних механізмів глюкозної регуляції та автофагії у неконвенційних дріжджів, а також результати, які можуть мати важливе практичне значення для біотехнології і медицини. Дисертація виконана на високому методичному рівні і є завершеним науковим дослідженням. Сукупність отриманих у дисертації результатів являє значний інтерес для клітинних біологів, молекулярних генетиків та мікробіологів.

Підсумовуючи вищенаведене, докторська дисертація Стасика О.В. «Молекулярні механізми вуглецевої катаболітної регуляції та гомеостазу пероксисом у метилотрофних дріжджів» за актуальністю, обсягом і змістом проведених досліджень, науковою новизною і практичним значенням відповідає вимогам п. 10, 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 заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія.

Директор Інституту мікробіології і вірусології  
НАН України ім. Д.К.Заболотного,  
доктор біологічних наук, професор,  
академік НАН України

 В. С. Підгорський

Штатпис *Підгорського В.С.*  
посвідчується  
зав. канцелярії *Мон (Коваль І.В.)*

