

СПЕЦІАЛІЗОВАНА ВЧЕНА РАДА ДФ 35.246.003

Інституту біології клітини НАН України

УХВАЛИЛА:

рішення спеціалізованої вченої ради

про присудження ступеня доктора філософії

Спеціалізована вчена рада Інституту біології клітини Національної академії наук України, м. Львів

(повне найменування закладу вищої освіти (наукової установи), підпорядкування (у родовому відмінку), місто)

прийняла рішення про присудження ступеня доктора філософії галузі знань 09 Біологія
(галузь знань)

на підставі прилюдного захисту дисертації «Механізми дії нових регуляторних факторів синтезу рибофлавіну у флавіногенних дріжджів»

(назва дисертації)

за спеціальністю 091 біологія

(код і найменування спеціальності відповідно до Переліку галузей знань і спеціальностей, за якими здійснюється підготовка здобувачів вищої освіти)

"12" жовтня 2022 року.

Андресвій Юлії Андріївни, 1995 року народження,

(прізвище, ім'я, по батькові (у разі наявності) здобувача)

громадянка України

(назва держави, громадянином якої є здобувач)

освіта вища: закінчила у 2018 році Львівський національний університет імені Івана Франка

(найменування закладу вищої освіти)

за спеціальністю Біологія

(за дипломом)

Навчається в аспірантурі в Інституті біології клітини Національної академії наук України, м. Львів

(посада, місце основної роботи, відомче підпорядкування, місто)

з 2019 р. до цього часу.

Дисертацію виконано в Інституті біології клітини Національної академії наук України,

м. Львів

(найменування закладу вищої освіти (наукової установи), підпорядкування, місто)

Науковий керівник Сибірний Андрій Андрійович

(прізвище, ім'я, по батькові (у разі наявності),

доктор біологічних наук, професор, академік НАН України, Інститут біології клітини Національної академії наук України, директор.

(науковий ступінь, вчене звання, місце роботи, посада)

Здобувач має три наукових публікації за темою дисертації, з них дві статті – у періодичних наукових виданнях інших держав, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus, одна стаття – у науковому фаховому виданні України:

1. Tsyurulnyk, A. O., **Andreieva, Y. A.**, Ruchala, J., Fayura, L. R., Dmytruk, K. V., Fedorovych, D. V., and Sibirny, A. A. (2020). Expression of yeast homolog of the mammal *BCRP* gene coding for riboflavin efflux protein activates vitamin B₂ production in the flavinogenic yeast *Candida famata*. *Yeast*, 37(9–10), 467–473. <https://doi.org/10.1002/yea.3470>. Q2.

2. **Andreieva, Y., Lyzak, O., Liu, W., Kang, Y., Dmytruk, K., and Sibirny, A.** (2020). *SEF1* and *VMA1* Genes Regulate Riboflavin Biosynthesis in the Flavinogenic Yeast *Candida famata*. *Cytology and Genetics*, 54(5), 379–385. <https://doi.org/10.3103/s0095452720050023>. Q4.

3. **Andreieva, Y., Petrovska, Y., Lyzak, O., Liu, W., Kang, Y., Dmytruk, K., and Sibirny, A.** (2020). Role of the regulatory genes *SEF1*, *VMA1* and *SFU1* in riboflavin synthesis in the flavinogenic yeast *Candida famata* (*Candida flareri*). *Yeast*, 37(9–10), 497–504. <https://doi.org/10.1002/yea.3503>. Q2.

У дискусії взяли участь голова і члени спеціалізованої вченої ради та присутні на захисті фахівці:

Голова ради – Гончар М. В., д.б.н., професор, завідувач відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України. *Оцінка позитивна, із зауваженнями:* «Слід уникати англіканізмів, зокрема, як одиниці вимірювання активності ферментів, замість «U/ml», слід вживати «Од./мл.»».

Рецензент – Закальський А. Є., к.б.н., доц, науковий співробітник відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України, *надав позитивну рецензію із зауваженнями:*

1. Використання умовних позначень в тексті дисертації не впорядковане; після умовного позначення знову з'являється повна назва і навпаки. Деяких умовних позначень, які є в тексті, немає в переліку.

2. Розділ 2.5 доцільно назвати «Поживні середовища, умови культивування мікроорганізмів»

3. У Розділі 2.6.2. не вказано умови визначення активності ферментів (температура, час інкубації. Як розраховували активність ферментів? В яких одиницях виражали активність?

4. Розділ 2.8. доцільно назвати «Визначення концентрації рибофлавіну»

5. У тексті дисертації написано, що нагромадження біомаси штамом *vma1Δ* зменшилось в 2,8 раза порівняно зі штаммом L20105, а згідно з результатами, поданими в таблиці 3.1, – в 1,4 раза. Які результати коректні?

6. На Рис. 3.2.Б і 3.6.Б не вказано розміри маркерів ДНК на фотографіях гелів після електрофоретичного розділення фрагментів ДНК.

7. У списку використаних джерел є чотири статті українською мовою, розміщених після публікацій латинським шрифтом. Згідно з вимогами першими у списку повинні бути публікації кириличним шрифтом.

8. Деякі статті, які опубліковані в журналах «Биохимия», «Микробиология», «Генетика», російською мовою в списку подані як англomовні.

Запитання:

1. Ефект делеції гена *VMA1* вакуолярної АТФ-ази у дріжджів *Pichia guilliermondii* виявлено більше 10 років тому. Чи вдалося з'ясувати причини і механізм негативної регуляції геном *VMA1* біосинтезу рибофлавіну?

2. Вами показано, що промотори гена-активатора транскрипції *SEF1* із флавіногенних дріжджів відновлюють здатність до надсинтезу рибофлавіну штамом *sef1Δ* на відміну від промоторів цього гена з нефлавіногенних дріжджів. Які можуть бути причини цього феномену? Чи аналізували послідовності промоторів?

Рецензент – Стасик О. В., д.б.н., старший дослідник, завідувач відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біології клітини НАН України, *надав позитивну рецензію із зауваженнями та запитаннями:*

1. Стор. 68 – варто у тексті вказати, у яких регуляторних процесах бере участь Sef1 у нефлавіногенних дріжджів, а також яка гомологія – загальна та у зоні ДНК-зв'язуючих доменів, у білків Sef1 з різних видів дріжджів. Чи є філогенетична спорідненість (групування) білків Sef1 саме з флавіногенних видів?

2. Стор. 75 – варто тут навести філогенетичне дерево, яке включає згадані види та відображає філогенетичне положення флавіногенних видів стосовно біорізноманіття дріжджів.

3. Стор. 91 – чи не розглядали варіант, що встановлена «точкова» (dot-like) периферійна локалізація Rfe1 екскретази може бути не зовсім «виключно мембранною», а, скажімо, ендо-, чи екзосомною? Оскільки локалізація у плазматичній мембрані, як правило, є більш рівномірною, добре було б послатись у роботі на відповідний контроль, скажімо відомого транспортера плазматичної мембрани, якщо такі відомі у *S. famata*.

4. Стор. 95 – чи є спільні риси між промоторами гену *SEF1* у флавіногенних дріжджів проти інших видів?

Опонент – Остап Б. О., д.б.н., проф. гол.н.с. кафедри генетики та біотехнології, проф. кафедри генетики та біотехнології Львівського національного університету імені Івана Франка, *надав позитивний відгук із зауваженнями:*

1. В огляді літератури описано низку біохімічних трансформацій, але є вкрай мало ілюстрацій (лише дві – структурні формули рибофлавіну та похідних сполук та загальну схему флавіногенезу). На мою думку, повнішому розумінню цієї інформації сприяли б зображення відповідних метаболічних шляхів, з наведенням хімічних формул, а не лише абревіатур.

2. У методах і в результатах дисертації немає згадки про верифікацію плазмід експресії генів методами секвенування ДНК. Наскільки здобувачка впевнена, що використані конструкції не містять сторонніх генетичних перебудов чи помилок ПЛР, які впливатимуть на отримані результати?

3. Рис. 3.5 (стор. 68) зображує дендрограму амінокислотних послідовностей, отриманих з результатів пошуку локальних хітів до заданого білка програмою BLASTP. З опису цієї схеми методу складно зрозуміти, чи є у масиві послідовності аутгруп (outgroup) – послідовність, що є таксономічно та філогенетично віддалена від решти, яка дає змогу коректно розташувати корінь дерева. Алгоритмічна надбудова BLAST TreeView не генерує філогенетичне дерево у повному значенні цього терміну, це distancetree (дерево відстаней, або дерево-провідник). Незрозуміло, котрі з виявлених послідовностей походять з флавіногенних, котрі – з нефлавіногенних дріжджів. Цю інформацію можна було б схематично навести праворуч від дендрограми, що значно полегшило б розуміння висновків здобувачки. В такому вигляді дані, як вони наведені в дисертації, не дають змоги погодитися з твердженням про ближчу спорідненість певних білків у масиві – див. наступне зауваження.

4. Далі в описі (стор. 68) дисертантка пише про “...певний рівень гомології”. Гомологія – це припущення про спільне еволюційне минуле певних об'єктів (тут – амінокислотних послідовностей), і не може мати ступенів чи рівнів порівняння. Натомість, здобувачка пише про рівні ідентичності послідовностей, які можуть бути більшими чи меншими, і на основі яких можна висувати припущення про гомологію. Втім, якщо усі знайдені послідовності у попарних вирівнюваннях мали число очікування E менше 0,05, то для жодної з них відкинути припущення про гомологію не можна. Тут варто лише зазначити, що певні послідовності подібніші між собою, ніж з іншими.

5. Вивчення різних промоторів з ортологічної групи SEF1, стор. 73-75. Вивчення цього гена займає важливе місце в дисертації, і повнішого розуміння результатів можна було б досягти при докладнішому описі що відомо і що, власне, зроблено. Доречною в огляді літератури була б інформація про операторну послідовність цього транскрипційного фактора (чи згадка про відсутність таких даних); подібність/відмінність структури доменів “цинкові пальці” у тих білках, промотори генів яких досліджували; в результатах і обговоренні – розміри клонованих промоторів і дані про авторегуляторні властивості Sef1.

Опонент – Корнійчук О.П., д.мед.н., проф., завідувачка кафедри мікробіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, *надала позитивний відгук із зауваженнями та запитаннями:*

Зауваження:

1. Назва ілюстрації Рис. 3.18. не є коректною – «Зображення флуоресцентної мікроскопії клітин *S. famata*...». Переважно під назвою рисунка вказують конкретно об'єкт, зазначаючи збільшення або «Мікрофотографія ...».

2. Показники, подані у таблиці 3.1., 3.7. не містять критеріїв їхньої достовірної відмінності. Чи Ви їх не порівнюєте?

3. Можливо, доцільно було б розділити графік на Рисунку 3.9. Б ще на два графіки. На одному із них порівнювати синтез рибофлавіну вихідними штамми і штамми з найвищою продукцією. А на іншому – вихідними штамми і штамми з низьким рівнем продукції рибофлавіну.

Запитання:

1. Які сполуки, окрім рибофлавіну, можна одержувати за використання дріжджів *S. famata* як продуцентів? Чи відомо щось про дослідження, проведені в цьому напрямку?

2. Якою мірою потрібно підвищити рівень синтезу рибофлавіну за використання отриманих Вами штамів аби вони були конкурентно здатними на промисловому рівні?

3. Чи є шляхи зниження кількості утворення токсичного 6-фосфоглюконолактону в клітинах штама BRP/ZWF1 для оптимізації умов одержання флавінів?

4. Чому, на Вашу думку, не вдалося отримати делеційні штами за геном *VMA1* на основі надпродуцентів AF-4 та BRP?

Сибірний Андрій Андрійович, д.б.н., проф., акад. НАН України, директор Інституту біології клітини Національної академії наук України, науковий керівник здобувача. *Оцінка позитивна, без зауважень.*

Федорович Дарія Василівна, д.б.н., проф., провідний науковий співробітник відділу молекулярної генетики і біотехнології Інституту біології клітини НАН України. *Оцінка позитивна із зауваженнями:* «Вважаю, що синтез рибофлавіну штамми дріжджів, що вже наявні в колекціях Інституту біології клітини, варто збільшити не у 15 разів, порівняно із промисловими штамми, а вдвічі аби досягти конкурентного рівня. Адже вони здатні синтезувати 16 г/л у ферментерах. Також слід було наголосити в презентації на тому, які зі штамів, що Ви використовували для введення плазмід, вже здатні до надпродукції, а які – ні, і детальніше розказати про те, наскільки ефективні Ваші результати.»

Дмитрук Костянтин Васильович, д.б.н., старший науковий співробітник відділу молекулярної генетики і біотехнології, заступник директора з наукової роботи Інституту біології клітини НАН України. *Оцінка позитивна, без зауважень.*

Семків Марта Віталіївна, к.б.н., науковий співробітник відділу молекулярної генетики і біотехнології Інституту біології клітини НАН України. *Оцінка позитивна, без зауважень.*

Результати відкритого голосування:

«За» - 5 членів ради,

«Проти» - немає,

«Утрималися» - немає.

На підставі результатів відкритого голосування разова спеціалізована вчена рада **присуджує** Андреевій Юлії Андріївні

(прізвище, ім'я, по батькові (у разі наявності) здобувача у давальному відмінку)


ступінь доктора філософії з галузі знань 09 - Біологія

(галузь знань)

за спеціальністю 091 - Біологія

(код і найменування спеціальності відповідно до Переліку галузей знань і спеціальностей, за якими здійснюється підготовка здобувачів вищої освіти)

Голова
спеціалізованої
вченої ради


(підпис)

Гончар М. В.
(прізвище, ініціали)



1 Каруєтук К. Є.!
*(Заступник директора,
із каучово-організаційних
штанів ІБК НАН України)*