Облікова картка дисертації

I. Загальні відомості

Державний обліковий номер: 0821U101024

Особливі позначки: відкрита

Дата реєстрації: 28-05-2021

Статус: Захищена

Реквізити наказу МОН / наказу закладу:

II. Відомості про здобувача

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Дзанаєва Любов Сергіївна

2. Dzanajeva Lubov S.

Кваліфікація:

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Вид дисертації: доктор філософії

Аспірантура/Докторантура: так

Шифр наукової спеціальності: 091

Назва наукової спеціальності: Біологія. Біологія

Галузь / галузі знань:

Освітньо-наукова програма зі спеціальності: Не застосовується

Дата захисту: 11-05-2021

Спеціальність за освітою: Фармацевтична біотехнологія

Місце роботи здобувача: Інститут біології клітини Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 25255758

Місцезнаходження: вул. Драгоманова, буд. 14/16, м. Львів, Львівська обл., 79005, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

III. Відомості про організацію, де відбувся захист

Шифр спеціалізованої вченої ради (разової спеціалізованої вченої ради): ДФ 35.246.001

Повне найменування юридичної особи: Інститут біології клітини Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 25255758

Місцезнаходження: вул. Драгоманова, буд. 14/16, м. Львів, Львівська обл., 79005, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

IV. Відомості про підприємство, установу, організацію, в якій було виконано дисертацію

Повне найменування юридичної особи: Інститут біології клітини Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 25255758

Місцезнаходження: вул. Драгоманова, буд. 14/16, м. Львів, Львівська обл., 79005, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

V. Відомості про дисертацію

Мова дисертації:

Коди тематичних рубрик:

Тема дисертації:

1. Ідентифікація генів, залучених в регуляцію алкогольної ферментації ксилози у рекомбінантних штамів Saccharomyces cerevisiae.

2. Identification of genes involved in the regulation of alcoholic fermentation of xylose in recombinant strains of Saccharomyces cerevisiae.

Реферат/анотація:

1. Одним з основних пріоритетів сьогодення є розробка ефективної технології отримання альтернативних джерел енергії. До складу гідролізатів лігноцелюлози входять два основні цукри: глюкоза, яка зброджується в першу чергу, та ксилоза. Ідентифікація нових генів, які можуть бути мішенями у регуляції алкогольної ферментації ксилози з метою подальшої їх інженерії є актуальним завданням. За допомогою флуориметричного та флуоресцентного аналізів показано, що пероксисоми Saccharomyces cerevisiae довше зберігалися під час ферментації ксилози ніж на глюкозі. З метою дослідження ролі не окремих пероксисомних ферментів а цілих цих органел здійснено делецію гена PEX3, що кодує пероксисомний мембранний білок. Вперше було показано, що дефіцит пероксисом призводить до зниження накопичення

етанолу з ксилози штамом pex3Δ в 1,5 раза порівняно з вихідним штамом. Досліджено рівень АФК в клітинах штаму GS010 під час ферментації глюкози та ксилози, та показано що катаболізм ксилози супряжений з генерацією підвищеної кількості АФК. При ферментації саме ксилози зафіксовано у 1,7-1,8 раза вищий рівень АФК. Вперше встановлено роль пероксисомної каталази Cta1 в процесі алкогольної ферментації ксилози у рекомбінантного штаму S. cerevisiae. Делеція гена CTA1 призводила до обмеження приросту біомаси та зниження продукції етанолу в 2 рази при порівнянні з вихідним штамом. За рахунок активності цитозольної ізоформи активність каталази у штамі cta1Δ була у 6 разів нижчою порівняно з реципієнтним штамом. Встановлено, що посилення експресії гена PEX34, що кодує пероксисомний інтегральний мембранний білок, приводить до формування пероксисом більшого розміру та підвищує в 1,4 раза продукцію етанолу з ксилози за умов алкогольної ферментації. Під час виконання даної роботи на основі ксилозо-ферментуючого штаму S. cerevisiae сконструйовано колекцію штамів з делецією та посиленою експресією низки генів ADR1, CAT8, ASG1, HAP4, SIP4, TUP1 та ZNF1, що кодують транскрипційні фактори та досліджено їх вплив на алкогольну ферментацю ксилози. Транскрипційний фактор Znf1 S. cerevisiae належить до родини транскрипційних активаторів цинкового кластеру та зв'язується з промоторами генів, продукти яких беруть участь у клітинному диханні, глюконеогенезі, циклі трикарбонових кислот та гліоксилатному шунті. Встановлено, що Znf1 не впливає на алкогольну ферментацію ксилози у S. cerevisiae, оскільки, як делеція так і посилення експресії ZNF1 не змінювали рівень продукції етанолу при ферментації цієї пентози. Транскрипційний фактор цинкового кластеру Sip4, який є субстратом протеїнкінази Snf1, взаємодіє з CSREs (cell type-specific regulatory elements) елементами і є активатором генів, що кодують ферменти глюконеогенезу. Продукція етанолу надекспресуючим штамом SIP4 була знижена більш ніж вдвічі, порівняно з батьківським, і становила 2,8 г/л. Транскрипційні регулятори Adr1 та Cat8 залежать від Snf1-опосередкованої індукції та здійснюють дерепресію низки генів, залучених у глюконеогенез та β-окислення. Встановлено, що як делеція так і посилена експресія ADR1 призводили до зниження продукції етанолу з ксилози, що становила 4,3 г/л для adr1Δ та 4,25 г/л для ADR1, тоді як вихідний штам GS010 продукував 5,85 г/л етанолу. Одержаний мутант cat8Δ демонстрував підвищення продукції етанолу з ксилози на 9,5% порівняно із батьківським штамом. Посилення експресії CAT8 напроти, призвело до зниження продукції етанолу на 7,3% порівняно з вихідним штамом GS010. Транскрипційний фактор Asg1 теж належить до родини цинкового кластеру та є регулятором генів кількох метаболічних шляхів: β-окислення, гліоксилатного циклу, глюконеогенезу, та імпорту довго-ланцюгових жирних кислот до пероксисом. Делеція ASG1 у штамі GS010 призвела до зниження продукції етанолу з ксилози у 1,23 раза. Tup1 - загальний репресор транскрипції, утворює комплекс з Cyc8, бере участь у створенні репресивної структури хроматину через взаємодію з гістонами H3 та H4. При ферментації ксилози штамом tup1Δ продукція етанолу була нижчою в 1,58 раза. Продукція етанолу з глюкози була нижчою в 1,26 раза. У S. cerevisiae ідентифіковано транскрипційний активатор Hap4, що відіграє ключову роль у контролі експресії генів мітохондріального дихання. Виявлено, що делеція HAP4 суттєво поліпшує продукцію етанолу при ферментації ксилози. Мутант продукує 10,4 г/л етанолу, при цьому вихід етанолу сягає 0,414 г/г ксилози. Натомість посилення експресії HAP4 призводило до зниження продукції етанолу при ферментації ксилози. У результаті роботи ідентифіковано нові мішені для створення продуцентів паливного етанолу на основі ксилозо-ферментуючих штамів дріжджів S. cerevisiae. Застосовані у роботі генно-інженерні підходи можуть бути екстрапольовані на інші перспективні дріжджові продуценти паливного етанолу. Сконструйовані штами можуть слугувати основою для подальших генно-інженерних маніпуляцій.

2. One of the main priorities today is to develop efficient technology for alternative energy sources. The composition of lignocellulose hydrolysates includes two main sugars: glucose, which ferments first, and xylose. Identification of new genes that may be targets in the regulation of alcoholic fermentation of xylose for further engineering is an urgent task. Saccharomyces cerevisiae fluorimetric and fluorescence analyzes showed that peroxisomes persisted longer during xylose fermentation than on glucose. To study the role not just individual peroxisomal enzymes but whole organelles, deletion of the PEX3 gene encoding a peroxisomal membrane protein was performed. For the first time it was shown that peroxisome deficiency leads to a decrease in the accumulation of ethanol from xylose in strain pex3Δ for 1,5 times as compared to the original strain. The ROS level in GS010

strain cells during glucose and xylose fermentation was studied, and it was shown that xylose is more actively involved in the generation of ROS. Namely, 1,7-1,8 times higher ROS levels were recorded during the fermentation of xylose. For the first time, the role of peroxisomal catalase in the process of alcoholic fermentation of xylose in a recombinant strain of S. cerevisiae was revealed. The CTA1 gene deletion led to a limitation of biomass growth and a 2 fold decrease in ethanol production compared to the original strain. The catalase activity in the cta1Δ strain was 6 times lower compared to the recipient strain. It was found that the overexpression of the PEX34 gene, encoding a peroxisomal integral membrane protein, leads to the formation of larger peroxisomes and increases by 1,4 times the ethanol accumulation level from xylose under alcoholic fermentation conditions. During this work, a collection of strains with deletion and enhanced expression of ADR1, CAT8, ASG1, HAP4, SIP4, TUP1, and ZNF1 genes encoding transcription factors was constructed based on the xylose-fermenting strain of S. cerevisiae and the mechanisms of regulation of alcoholic fermentation of xylose in the constructed strains were investigated. The transcription factor Znf1 S. cerevisiae belongs to the family of transcriptional activators of the zinc cluster and binds to the promoters of the genes whose products are involved in cellular respiration, gluconeogenesis, the tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt. It was found that Znf1 does not affect the alcoholic fermentation of xylose in S. cerevisiae, since both ZNF1 deletion and overexpression did not alter ethanol production during fermentation of this pentose. The transcription factor of the zinc cluster Sip4 is a substrate of the protein kinase Snf1, and interacts with CSREs elements and is an activator of genes encoding enzymes of gluconeogenesis. The production of ethanol by strain SIP4 was reduced more than twice compared to the parent strain and reached 2,8 g/l. Adr1 and Cat8 are transcriptional regulators that depend on Snf1-mediated induction and derepress a number of genes involved in gluconeogenesis and □-oxidation. We found that both deletion and overexpression of ADR1 led to a decrease in ethanol production from xylose, which was 4,3 g/l for adr1Δ and 4,25 g/l for ADR1, whereas strain GS010 showed 5,85 g/l of ethanol. The obtained cat8Δ mutant showed an increase in ethanol production from xylose by 9,5% compared to the parental strain GS010. Overexpression of CAT8, in contrast, led to a decrease in ethanol production by 7,3%. The transcription factor Asg1 also belongs to the Zn-cluster family and is a regulator of the genes of several metabolic pathways: □-oxidation, glyoxylate cycle, gluconeogenesis, and import of long-chain fatty acids to peroxisomes. Deletion of ASG1 led to a decrease in ethanol production from xylose by 1,23 times. Transcriptional repressor Tup1 forming a complex with Cyc8p, is involved in the creation of the repressive structure of chromatin through interaction with histones H3 and H4. During xylose fermentation ethanol production tup1Δ was 1,58 times lower, ethanol production from glucose was 1,26 times lower. In S. cerevisiae transcriptional activator Hap4 was identified, which plays a key role in controlling mitochondrial respiration gene expression. Deletion of HAP4 was found to significantly improve ethanol production during xylose fermentation. The mutant produces 10,4 g/l of ethanol, while the yield of ethanol reaches 0,414 g/g. Instead, increased expression of HAP4 led to the opposite effect, namely a decrease in ethanol production during xylose fermentation. As a result, new targets were identified to construct fuel ethanol producers based on xylose-fermenting S. cerevisiae yeast strains. The genetically engineered approaches used in the work can be extrapolated to other promising yeast producers of fuel ethanol. The engineered strains can serve as a basis for further genetic engineering manipulations.

Державний реєстраційний номер ДіР:

Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки:

Стратегічний пріоритетний напрям інноваційної діяльності:

Підсумки дослідження:

Публікації:

Наукова (науково-технічна) продукція:

Соціально-економічна спрямованість:

Охоронні документи на ОПІВ:

Впровадження результатів дисертації:

Зв'язок з науковими темами:

VI. Відомості про наукового керівника/керівників (консультанта)

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Дмитрук Костянтин Васильович

2. Dmytruk Kostiantyn Vasyliovych

Кваліфікація: д. б. н., 03.00.07

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

VII. Відомості про офіційних опонентів та рецензентів

Офіційні опоненти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Осташ Богдан Омелянович

2. Ostash Bohdan O.

Кваліфікація: д. б. н., 03.00.22

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Янєва Ольга Дорофіївна

2. Yanieva Olha D.

Кваліфікація: к. б. н., 03.00.07

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Рецензенти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Федорович Дарія Василівна

2. Fedorovych Dariya Vasylivna

Кваліфікація: д.б.н., 03.00.07

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Стасик Олег Володимирович

2. Stasyk Oleh V.

Кваліфікація: д. б. н., 03.00.11

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

VIII. Заключні відомості

Власне Прізвище Ім'я По-батькові голови ради Гончар Михайло Васильович

Власне Прізвище Ім'я По-батькові головуючого на засіданні Гончар Михайло Васильович

Відповідальний за підготовку облікових документів

Реєстратор

Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є відповідальним за реєстрацію наукової діяльності Юрченко Т.А.