

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Карпова Павла Андрійовича «Кіном мікротрубочок як невід'ємна складова регуляції тубулінового коду у рослин», подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія (091-біологія)

Актуальність роботи.

Мікротрубочки та молекули тубуліну належать до одних з найбільш консервативних елементів еукаріотичної клітини, проте проявляють значне морфологічне різноманіття і функціональну пластичність. Слід зазначити, що джерелом гетерогенності мікротрубочок є тубуліновий код - первинна і вторинна гетерогенність тубуліну. У рослин існує декілька ізотипів α - і β -тубуліну, які обумовлюють первинну гетерогенність мікротрубочок за рахунок індивідуальних особливостей окремих ізотипів тубуліну, а вторинна гетерогенність мікротрубочок виникає внаслідок посттрансляційних модифікацій, які призводять до локальних змін заряду, структури та локальних конформацій тубуліну.

Посттрансляційні модифікації тубуліна включають фосфорилування, ацетилювання, тирозилування, глютамілювання, метилування та інші типи модифікацій. Проте саме фосфорилування має в першу чергу відношення до структурної, динамічної і функціональної спеціалізації мікротрубочок. Консервативність тубуліну у представників різних царств, а також значна подібність окремих протеїназ, дають підставу припустити існування механізмів фосфорилування, що зберегли еволюційну консервативність. Водночас, навіть у випадку α -, β - і γ -тубуліну ссавців, функціональна роль великої кількості експериментально доведених сайтів та асоційованих з ними протеїназ залишаються невідомими. Отже, наше розуміння фосфорилування як одного з ключових факторів модуляції тубулінового коду до останнього часу залишалось фрагментарним.

В зв'язку з цим, дисертаційна робота Карпова П.А., присвячена вивченню рослинних протеїназ, причетних до безпосереднього фосфорилування α -, β - і γ -тубуліну, пошуку їх сайтів та з'ясуванню ролі фосфорилування у формуванні тубулінового коду вищих рослин як ключового фактору

функціональної гетерогенності мікротрубочок вищих рослин безумовно є актуальною і повністю відповідає сучасним тенденціям в розвитку клітинної біології.

В дисертаційному дослідженні Карповим П.А. був виконаний детальний аналіз спеціалізованих баз даних і здійснена реконструкція повного кіному модельної рослини *Arabidopsis thaliana*. Автором встановлено, що без врахування сплайс-ізоформ, кіном, *A. thaliana* складається з 1021 унікальних протеїнкіназ, що майже вдвічі перевищує кіном *Homo sapiens* (518 протеїнкіназ). Це підтверджує дані стосовно більш складної організації рослинних кіномів. В дисертаційній роботі було відібрано 105 тваринних протеїнкіназ, для яких існує експериментальне підтвердження причетності до регуляції цитоскелету і клітинного поділу у ссавців. Крім того, остаточний список потенційних протеїнкіназ було доповнено інформацією, відомою для окремих протеїнкіназ дріжджового, рослинного та тваринного походження. Порівняння послідовностей та 3D-структур дозволило автору визначити наявність у рослинних гомологів тваринних протеїнкіназ. Водночас, застосування профільного аналізу і структурного моделювання, дозволило автору визначити можливі сайти специфічного фосфорилування молекул тубуліну.

Виходячи з гомології послідовностей, даних профільного пошуку, кладистичного аналізу, даних структурної біоінформатики, результатів обрахунку молекулярної динаміки, автором було встановлено, що безпосередня участь у фосфорилуванні α -, β - і γ -тубуліну належить:

чотирьом протеїнкіназам групи AGC (родина IRE - IREN1 і GWL; родина S6K - KPK1 і KPK2);

двом протеїнкіназам групи CMGC (CDK1 і YAK1);

гетеротетрамерній протеїнкіназі СК2;

СК1-подібній протеїнкіназі - СКL6;

протеїнкіназам SnRK1 α (KIN10 і KIN11);

групі з дев'яти рослинних Ca²⁺-залежних протеїнкіназ, визначеним на підставі біоінформатичного дослідження: п'ять представників родини СРК

(CPK7 / At5g12480, CPK14 / At2g41860, CPK20 / At2g38910, CPK21 / AT4G04720, CPK32 / At3g57530), трьох представників родини CDPK/CRK: CRK2 (At3g19100), CRK3 (At2g46700) і CRK8 (At1g49580) і одного представника SnAK1-кіназ - GRIK2 (At5g60550).

Причетність найбільш важливих протеїнкіназ до регуляції тубулінового цитоскелету в роботі підтверджена експериментально з використанням методів генетичного клонування, трансформації, експериментів із залученням мутантних рослин, специфічних інгібіторів, флуоресцентної мікроскопії та ін. Автором було обгрунтовано, що решта відібраних протеїнкіназ, хоча і причетна до регуляції цитоскелету, скоріше за все не фосфорилує тубулін, і їхній вплив на систему мікротрубочок є опосередкованим. До останньої групи було віднесено протеїнкінази SKL2/CK1, SK1D/CK1, Aur1/AURA, Aur2/AUR(B/C), CDKA1/CDC2/CDK(2/5), STY17/ILK, СІРКQ/CHK1, МРК13/GSK3A, KSG5/GSK3B, ТІО/TBK1, АТГ1В/ТТК, CDPKW/TTN, IRE/MAST(1/3/4)/LATS1/2, IRE3/NDR1/ROCK1, EDR1/LRRK2, ANP1/TAO1, M3K3A/SLK/TAO2, ANP1/MAP3K(1/3), STY46/MAP3K7, SKL10/TTBK1, SKL5/TTBK2, ANP1/NEK7, CDKG1/CDKG1, СІРК8/PLK(1/3), STR1/RIPK(2/3), BUB1/BUB1 і BUBR1/BUBR1.

Отже, все зазначене підтверджує актуальність виконаного дослідження.

Структура роботи та обсяг. Дисертаційна робота Карпова П.А. побудована за традиційною структурою докторських дисертацій і складається з вступу, огляду літератури (розділи 1 і 2), матеріалів і методів (розділ 3) та 6 розділів, що викладають експериментальну частину досліджень, списку використаної літератури (637 джерел) і 8 додатків. Останній розділ експериментальної частини - Розділ 9, містить аналіз та узагальнення результатів дисертаційного дослідження. Загальний об'єм дисертації складає 545 старінок. Рукопис містить 21 таблицю і 132 рисунка оригінальних даних.

Вступ містить необхідну інформацію про актуальність теми, зв'язок роботи з науковими програмами, мету, завдання та методи дослідження. Наведено предмет та об'єкт дослідження, сформульовано наукову новизну

одержаних результатів та їх практичне значення, особистий внесок дисертанта та наведено дані про апробацію результатів дисертації.

Розділ «**Огляд літератури**» складається з двох підрозділів, містить аналіз літературних джерел. Проаналізовано сучасні роботи, присвячені дослідженню особливостей фосфорилування у рослин, а також, актуальна інформація стосовно причетності фосфорилування до формування тубулінового коду. Автор охарактеризував властивості протеїнкіназ, рослинні гомологи яких залучені в регуляції системи мікротрубочок і тубулінового цитоскелету. Окремо розглядаються протеїнкінази причетні до регуляції центрів первинної нуклеації мікротрубочок та тубулінового коду: AGC, CMGC / CK2, CK1 і CDPK-SnRK. Наведено ретельну характеристику представників різних родин в межах зазначених груп, а також аргументи автора стосовно їх причетності до регуляції цитоскелету і фосфорилування тубуліну. Представлений аналіз наукової періодики підтверджує актуальність обраної теми та дозволив обґрунтувати поставлені у роботі дослідницькі завдання.

Розділ «**Матеріали і методи дослідження**» містить повний опис методологічних аспектів біоінформатичного дослідження, розкриває аспекти визначення сайтів специфічного фосфорилування, структурно-біологічних досліджень, джерела структурної інформації, застосовані методи прогнозування і реконструкції просторової структури білків за гомологією, реконструкції ліганд-білкових і білок-білкових комплексів, визначення ролі сайтів специфічного фосфорилування на підставі їх структурної топології і результатів молекулярної динаміки. Також автор надає інформацію стосовно застосованих програмних інструментів, використаних обчислювальних ресурсів, лабораторних методів дослідження і верифікації участі рослинних протеїнкіназ в регуляції тубулінового цитоскелету вищих рослин, а саме: генетичного клонування, дослідження експресії флуоресцентних конструктів, застосування специфічних інгібіторів, мутантних ліній, постановки фізіологічних експериментів, методів мікроскопії.

Результати досліджень та їх обговорення представлено у шести розділах. У Розділі 4 Карпов П.А. аналізує результати біоінформаційного пошуку

рослинних протеїнкіназ, причетних до фосфорилування білків мікротрубочок та регуляції клітинного поділу. Автор наводить результати філогенетичної реконструкції кіному *A. thaliana* та визначення сайтів фосфорилування тубуліну. Основний акцент автором зроблено на біоінформатичному визначенні протеїнкіназ, що здатні безпосередньо фосфорилувати α -, β - і γ -тубулін.

Наступні чотири розділи (5-8) автор присвятив аналізу результатів стосовно груп протеїнкіназ для представників яких була визначена потенційна здатність до безпосереднього фосфорилування молекул тубуліну вищих рослин: AGC, CMGC / CK2, CK1, BUB1 і CDPK-SnRK. За допомогою різноманітних методів біоінформатичного, структурно-біологічного і лабораторного досліджень доведена участь визначених рослинних протеїнкіназ у регуляції системи мікротрубочок, мітотичного апарату вищих рослин і наслідків асоційованих з ними модифікацій молекул тубуліну.

Отримані автором результати підтвердили значну роль фосфорилування у всіх аспектах функціонування системи мікротрубочок вищих рослин і безпосередню участь у фосфорилуванні α -, β - і γ -тубуліну 4 протеїнкіназ групи AGC (родина IRE - IREN1 і GWL; родина S6K - KPK1 і KPK2), 2 протеїнкіназ групи CMGC (CDK1 і YAK1), гетеротетрамерного холоензиму CK2 (субодиниці: SKA1 / SKA2 / SKB1 / SKB2), ізотипу протеїнкінази CK1 - SKL6, протеїнкіназ SnRK1 α (KIN10 і KIN11), а також, групи з дев'яти рослинних Ca²⁺-залежних протеїнкіназ, визначених на підставі біоінформатичного дослідження: п'яти представників родини СРК (СРК7 / At5g12480, СРК14 / At2g41860, СРК20 / At2g38910, СРК21 / AT4G04720, СРК32 / At3g57530), трьох представників родини CDPK/CRK: CRK2 (At3g19100), CRK3 (At2g46700) і CRK8 (At1g49580) і одного представника SnAK1-кіназ - GRIK2 (At5g60550).

Останній розділ дисертації - Розділ 9, містить аналіз і узагальнення результатів дослідження. Автор надає остаточний переклик протеїнкіназ і узагальнену модель участі фосфорилування в формуванні тубулінового коду у вищих рослин.

Дисертація містить 17 висновків, які логічно впливають з проведених досліджень.

Список використаних літературних джерел складає 637 посилань, більша частина яких опублікована в останні 10 років.

Обґрунтованість і достовірність наукових результатів і висновків. Застосовані у роботі теоретичні підходи та лабораторні методи адекватні поставленим задачам. Зроблені у дисертації висновки логічно витікають із отриманих автором даних.

Науково-практична значимість роботи. Результати дисертаційної роботи Карпова П.А. суттєво розширюють наше уявлення щодо ензиматичної регуляції мікротрубочок рослин шляхом безпосереднього фосфорилування тубуліну і визначають ферменти і сайти такої модифікації. Це розширює перелік молекулярних мішеней і можливості впливу на процеси, безпосередньо пов'язані з функціональним станом мікротрубочок. Отримані дані утворюють теоретичний фундамент що зв'яже вплив зовнішніх і внутрішніх чинників з певними сигнальними каскадами і відповіддю системи мікротрубочок. Таким чином, визначення протеїнкіназ тубулінового коду має не лише фундаментальне значення, але і відкриває новий етап залучення визначених протеїнкіназ як перспективних молекулярних мішеней нових інноваційних технологій захисту

Повнота викладення основних результатів досліджень у наукових фахових виданнях. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 65 наукових праць, з них 27 статей у фахових виданнях (зокрема, 3 – у виданнях Q1, 2 – у виданнях Q3), 2 розділи монографій, виданих закордонними видавництвами, 38 тез доповідей міжнародних та вітчизняних конференцій.

Опонент не має принципових зауважень до ідеї, методів структури і результатів роботи. Однак, під час аналізу дисертації виникла низка запитань рекомендаційного та дискусійного характеру, а також зауважень до викладення і технічного оформлення рукопису:

Зауваження щодо змісту та оформлення рукопису дисертації:

1. Дисертантом в огляді літератури не аналізується існування природно неструктурованих білків в протеомах рослин і тварин, що суттєво обмежує визначення їх структури методами рентгеноструктурного аналізу. В цьому випадку застосування методів структурної

біоінформатики для моделювання їх структури є практично єдиним можливим підходом.

2. У розділі «Матеріали та методи досліджень», автор занадто деталізує опис стандартних генетичних векторів і протоколів трансформації, що є надмірним, оскільки в більшості випадків зазначені протоколи відповідають рекомендаціям виробника і наведені на їх офіційних сайтах.

3. Незрозуміло, чому маючи доступ до обчислювальних потужностей Інституту та віртуальних організацій Національної академії наук України ряд обрахунків молекулярної динаміки має досить короткий час симуляції. Для отримання достовірних результатів моделювання бажано проводити більш тривалі обчислення.

4. Виникає питання, чому при дослідженні рослинних гомологів протеїнкінази MAST2 спочатку аналізувався каталітичний фрагмент гену *Vitis vinifera*, а наступне дослідження вже виконувалось із залученням гомологу з *A. thaliana*. Чим обумовлено зміну об'єкту, якщо було доведено що рівень ідентичних амінокислот у випадку MAST2 людини і GMLK винограду вище ніж у випадку гомологу з *A. thaliana*?

5. Зараз існує декілька моделей взаємодії γ -тубуліну з гетеродимером $\alpha\beta$ -тубуліну. Найбільш розповсюдженою і пріоритетною є та, що формування мікротрубочки починається з контакту між γ - і α -тубуліном $\alpha\beta$ -гетеродимеру ($\gamma/\alpha/\beta$). Так саме, автор притримується цієї моделі взаємодії на протязі викладення матеріалу дисертації. Чим обумовлено те, що на фінальному рисунку автореферату (**Рис. 25.** «Узагальнена схема розташування сайтів фосфорилування...») була застосована альтернативна модель $\gamma/\beta/\alpha$.

6. Більшість відомих робіт розглядають тубуліновий код виключно в межах модифікацій α - і β -тубуліну. Також існують публікації що окремо розглядають модифікації тваринного і дріжджового γ -тубуліну, в межах посттрансляційної регуляції центросом (МТОС). Як відомо, у рослин центросоми відсутні, але автором наводиться модель яка передбачає консервативність основного структурного елемента γ -тубулінового комплексу рослин, а також, певну консервативність визначених сайтів. Наскільки це

правомірно у випадку рослинної клітини і наскільки консервативні зазначені структури у рослин, тварин і дріжджів.

7. Рукопис дисертації має деякі скорочення, що потребують повної розшифровки та ретельної перевірки. В дисертації також зустрічаються невдалі вирази та друкарські помилки.

Проте, в цілому наведені недоліки не є принциповими та не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Підводячи підсумок, слід зазначити, що дисертація Карпова Павла Андрійовича є актуальним, оригінальним логічно завершеним дослідженням, виконаним на сучасному методичному рівні і має високе наукове та практичне значення. Дисертант проявив вміння критично викласти та коректно інтерпретувати результати проведених власних досліджень. Дисертація містить значний об'єм оригінальних даних, добре ілюстрована, а достовірність представлених даних не викликає сумнівів.

На підставі викладеного вважаю, що дисертаційна робота Карпова Павла Андрійовича «Кіном мікротрубочок як невід'ємна складова регуляції тубулінового коду у рослин», за актуальністю, обсягом і змістом проведених досліджень, за науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів без сумніву відповідає вимогам п.п. 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 - цитологія, клітинна біологія, гістологія (091 - біологія).

Завідувач відділу

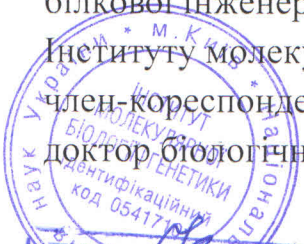
білкової інженерії та біоінформатики,

Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

член-кореспондент НАН України,

доктор біологічних наук, професор

О.І. Корнелюк



Підписав *Корнелюк О.І.*
посвідчується
Зав. відд. М. Медведько