ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу Краснопьорової Олени Євгенівни «Серин-треонінові протеїнкінази SnRK1 (KIN10 та KIN11) *Arabidopsis thaliana*: особливості функціонування та участь в поділі клітин», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.22 – молекулярна генетика

Проблема пошуку молекулярних механізмів регуляції процесів росту і розвитку рослин у відповідь на зміни умов зовнішнього середовища, зокрема через зміни вуглеводного метаболізму є важливою проблемою сучасної біології рослин. Надважливими компонентами цих процесів є протеїнкінази, які відіграють важливу роль у посттрансляційній регуляції білків-компонентів сигнальних шляхів. Зокрема, протеїнкінази підродини SnRK1 вважаються регулятором енергетичного гомеостазу клітин, який інтегрує енергетичний сигнал з біосинтетичними та катаболічними процесами, і в результаті, з ростом рослини та бере участь в реакції на різні абіотичні та біотичні стресові чинники. Тим не менше, особливості структури ферментативного комплексу SnRK1 та його функціонування у рослин з'ясовано лише частково. Зокрема, залишається недослідженою його здатність взаємодіяти з елементами цитоскелету та через те впливати на процеси клітинного поділу. Зважаючи на це, дисертаційна робота Олени Євгенівни Краснопьорової, основною метою якої було дослідити особливості функціонування каталітичних субодиниць протеїнкінази SnRK1 - KIN10 та KIN11, експресії їх генів за стресових умов та можливість їх залучення до поділу клітин, лежить в площині актуальних проблем сучасної біології.

Робота виконана в ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» у рамках бюджетних тем відділу клітинної біології і біотехнології та відділу геноміки та молекулярної біотехнології.

Дисертація викладена на 160 сторінках і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел і додатка.

Перший розділ дисертації присвячений огляду літератури за обраною темою і має назву «Протеїнкінази та їх функції в рослинах». Автор наводить класифікацію протеїнкіназ еукаріот, описує сучасні уявлення про особливості структури і функціонування серин/треонінових протеїнкіназ, відмічає їх участь у багатьох клітинних процесах, зокрема, регуляції клітинного циклу, надає характеристику окремих родин цього класу ферментів, зупиняється на характеристиці родини SnRK (sucrose non-fermenting–related kinase) та дає детальний опис структури і функцій підродини SnRK1. Зокрема, дисертантка розкриває особливості взаємодії, регуляції активності та функціонування трьох субодиниць α, β і γ даного ферментативного комплексу, детально описує участь протеїнкінази SnRK1 та її α-субодиниць KIN10 та KIN11 у різноманітних клітинних процесах та регуляції росту і розвитку рослин. Виходячи з того, що найближчими гомологами SnRK1 рослин вважаються протеїнкіназа SNF1 дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* і протеїнкіназа АМФК ссавців, автор описує важливі особливості структури і функціонування цих ферментів. Представлено аналіз літературних відомостей щодо ролі фосфорилювання та відповідних ферментів у регуляції елементів цитоскелету рослин, який відіграє особливу роль в трансдукції внутрішньоклітинних сигналів і є важливим елементом різноманітних клітинних процесів, включаючи поділ клітин. Відмічається схожість сайтів фосфорилювання певних протеїнкіназ у тварин і рослин. Окремо аналізується протеїнкіназа BRSK1 тварин, яка тісно пов'язана з цитоскелетом і поділом клітин, та повідомляється про попередні дані щодо високої схожості BRSK1 з представниками підродини протеїнкіназ SnRK1 у рослин (Karpov et al., 2010). Слід відзначити, що огляд базується на результатах актуальних сучасних досліджень, представлених переважно в англомовних публікаціях. Підсумовуючи оглядовий розділ, дисертантка відзначає, що її робота спрямована на вивчення структури протеїнкіназ SnRK1, їх генної експресії за нормальних умов та у відповідь на дію абіотичних чинників, внутрішньоклітинної локалізації, а також можливого залучення до регуляції білків цитоскелету та поділу рослинних клітин,

обґрунтовує вибір для більш глибокого дослідження ізоформи KIN10, яка характеризується високою активністю.

У розділі 2 детально описано матеріали і методи досліджень. Наводяться модельні об’єкти, на яких проведено дослідження: *Arabidopsis thaliana* екотипу Col-0, його трансгенні лінії та нокаутні мутанти, суспензійні культури *A. thaliana* та *Nicotiana tabacum* BY-2. Наводиться перелік використаних у роботі реактивів. Відповідно до поставлених мети та завдань автором використано потужний арсенал методів, зокрема, біоінформатичні (сканування BLASTp, вирівнювання амінокислотних послідовностей, аналіз архітектури домену, кладистичний аналіз, передбачення сайтів фосфорилювання, 3D-моделювання), молекулярно-генетичні (створення генетичних конструкцій з химерними генами, трансформація протопластів, трансформація конструкціями бактеріальних клітин *E. coli* та виділення плазмідної ДНК, виділення та трансформація протопластів *A. thaliana* та суспензійних клітин BY-2, зворотна транскрипція і полімеразна ланцюгова реакція (ЗТ-ПЛР) та кількісна ЗТ-ПЛР), цитологічні (визначення проліферативної активності клітин, імунофлуоресцентний аналіз розподілу γ-тубуліну), морфометричні методи, а також методи математичної статистики. Складено перелік протеїнкіназ - ймовірних гомологів підродини SnRK1 з різних організмів, відібраних для кладистичного аналізу.

У розділі 3 представлено результати досліджень та їх обговорення. В рамках кладистичного аналізу протеїнкіназ дисертанткою виділено KIN10, KIN11 та SNRK1.3 *A. thaliana* в окрему кладу та доведено їх високу подібність до протеїнкіназ BRSK людини, а також показано високу подібність KIN10 та KIN11 з протеїнкіназами SNF1, які є енергетичними сенсорами та ключовими регуляторами метаболізму в дріжджах. На основі порівняння підродин SnRK1, SnRK2 і SnRK3 визначено більш високу гомологію між членами підродини SnRK1 у різних видів, ніж трьома підродинами в *A. thaliana* та висловлене припущення про подібність функцій SnRK1 до 5′-АМФ-активуючих протеїнкіназ тварин, які є регуляторами низки важливих клітинних процесів, зокрема проліферації.

Шляхом порівняння доменної структури ізоформ SnRK1 *A. thaliana* і BRSK1 людини дисертанткою виявлено убіхітин-асоційований домен у всіх SnRK1, що стало основою для припущення схожості механізмів регуляції у цих рослинних протеїнкіназ і двох BRSK1. Визначено С-кінцевий кіназний домен 1 (KA1) у двох ізоформ KIN10 та лише в одній з двох ізоформ KIN11. За допомогою 3D-моделювання просторової структури підтверджено високу подібність структурної організації KIN10 і BRSK1 та ідентичність каталітичних доменів у KIN10, KIN11 та BRSK1.

Дисертанткою створено векторні генетичні конструкції, які містили химерні гени *KIN10-BFP* та *KIN10-RFP* та проведено трансформацію протопластів відповідно суспензійної культури BY-2 тютюну та протопластів *A. thaliana*. Встановлено локалізацію цього білка у цитоплазмі, переважно у примембранній області.

Проведено аналіз експресії *KIN10* в органах двомісячних рослин *A. thaliana* та визначено високі рівні експресії в надземних органах (стеблі, листках, квітках) та нижчий рівень – в корені.

Вивчення трансгенних ліній *A. thaliana* з гіперекспресією та РНК-інтерференцією *KIN10* визначило, що як підвищений рівень експресії цього гена, так і редукований призводять до зниження ростової активності коренів у проростків. При цьому зроблено важливе спостереження, що в лінії з гіперекспресією *KIN10* (ОХ) цей ефект був більш вираженим на середовищі з сахарозою, тоді як в лінії з РНК-інтерференцією *KIN10* (РНКі) більша затримка росту кореня виявлялась на середовищі без сахарози. Автор справедливо відзначає, що такий ефект може бути пов’язаний з порушеннями внаслідок підвищення або зниження рівня експресії *KIN10* сигнальних процесів та метаболізму глюкози, які регулюються цим ферментом. Суттєвість регуляторних функцій KIN10 також підтверджується спостереженнями того, що зміни в рівні експресії його гена призводили до змін морфології головного кореня, що також залежало від наявності сахарози. Спираючись на літературні відомості, дисертантка припускає зв'язок цих морфологічних змін з порушеннями функціонування цитоскелету, зокрема мікротрубочок.

Наступним логічним кроком даного дослідження стало визначення проліферативної активності апікальної меристеми коренів у проростків нокаутних мутантів *kin10* та *kin11*. Показано зниження мітотичного індексу у 4-5 разів при порушенні експресії цих генів та залежність цього ефекту від наявності сахарози у середовищі. Цьому відповідав низький рівень експресії маркерних генів клітинної проліферації *CYCB1;1* та *AtBRCA1* у обох мутантів, що було більш виражене в умовах відсутності сахарози в середовищі. На підставі цього автором висловлено гіпотезу про можливість існування певної позитивної кореляції між інтенсивністю проліферації та рівнем експресії генів *KIN10* та *KIN11*. Для перевірки цього здійснено порівняння експресії цих генів у суспензійної культури та інтактних проростків *A. thaliana*. Показано підвищений рівень експресії як *KIN10* і *KIN11*, так і маркерних генів клітинної проліферації *CYCB1;1* і *AtBRCA1* у клітин суспензійної культури, що також є опосередкованим підтвердженням зв'язку між функціонуванням *KIN10* і *KIN11* та поділом клітин. Також відзначено вищий рівень експресії *KIN10* порівняно з *KIN11* та зроблено висновок про більш високе функціональне навантаження KIN10 порівняно з KIN11 в підродині SnRK1.

В результаті вивчення взаємозв’язку між функціонуванням KIN10 і KIN11 з тубулиновим цитоскелетом шляхом вимірювання флуоресценції γ-тубуліну в меристематичних клітинах нокаутних мутантів *kin10* та *kin11* дисертанткою визначено нижчу інтенсивність флуоресценції за відсутності експресії цих генів, що було більш виражене за відсутності сахарози. Отримані дані, на думку автора, вказують на існування безпосереднього зв'язку між функціонуванням центрів первинної нуклеації мікротрубочок та активністю *KIN10* та *KIN11*. На користь цього також свідчить виявлена колокалізація KIN10 та γ-тубуліну в клітинах коренів проростків *A. thaliana.*

Враховуючи високу гомологію та подібність структури каталітичних доменів протеїнкіназ KIN10 та BRSK1, дисертанткою здійснено ідентифікацію та реконструкцію локалізації потенційного сайту фосфорилювання γ-тубуліну протеїнкіназою KIN10 у *A. thaliana*, підтверджено можливість фосфорилювання цим ферментом залишку Сер-131

γ-тубуліну, встановлено, що цей сайт присутній лише в двох ізоформах γ-тубуліну (TUBG1 і TUBG2), та показано, що Сер-131 експонується на поверхні цих молекул. Відзначено відсутність сайту фосфорилювання Сер-385 молекули BRSK1 у всіх ізоформ тубуліну *A. thaliana.* На основі отриманих даних робиться висновок, що взаємодія протеїнкіназ SnRK1, перш за все KIN10, з цитоскелетом може відбуватися шляхом фосфорилювання TUBG1 і TUBG2 по Сер-131. Припускається, що фосфорилювання Сер-131 може визначати взаємодію ізоформ γ-тубуліну та впливати на структуру малого γ-тубулінового комплексу γTuSC та формування кільцевого γ-тубулінового комплексу γTuRC.

Базуючись на отриманих даних, дисертантка запропонувала гіпотетичну схему взаємодій протеїнкінази KIN10 зі своїми мішенями у рослинних клітинах у порівнянні з протеїнкіназою BRSK1 у тварин.

Робота завершується ґрунтовним узагальненням і 8 висновками, які відображають основні наукові положення дисертації.

Отже, дисертаційне дослідження О.Є. Краснопьорової є суттєвим внеском у розвиток молекулярної генетики рослин. Автором отримано нові дані щодо структури та філогенетичної позиції протеїнкіназ KIN10 і KIN11 підродини SnRK1, різнобічно охарактеризовано їх функціональні сайти, переконливо показано їх участь у регуляції росту і морфогенезу рослин в залежності від енергетичного стану, доведено їх зв'язок з функціонуванням тубулінового цитоскелету та поділом клітин. Робота є фундаментальним дослідженням, яке значно розширює існуючі уявлення про протеїнкінази SnRK1 рослин, а також може бути корисною для створення нових технологій керування адаптацією рослин до змін енергетичного статусу.

В цілому, дисертаційна робота О.Є. Краснопьорової приємно вражає обсягом проведених експериментальних досліджень, багатим логічно викладеним матеріалом та його аналізом, виконана з використанням різноманітних сучасних методів та багатьох баз даних і має суттєвий потенціал для подальших перспективних досліджень.

Разом з тим, слід зробити кілька критичних зауважень.

Не повністю наданий перелік умовних скорочень. Наприклад, в переліку немає таких скорочень, як ОХ, РНКі, які широко використані в тексті. Крім того, в тексті зустрічаються скорочення без розшифровки, наприклад, CBD, CTD, MaMg, MMg та деяких інших.

У розділі «Матеріали і методи» у підрозділі 2.1. «Характеристика рослинного матеріалу» не наведено повних видових назв видів рослин.

Не вказано інтенсивність освітлення при вирощуванні рослин.

Для аналізу генної експресії було використано двомісячні рослин *A. thaliana*, очевидно, вирощені в ґрунті, проте умови їх вирощування не описано.

Надлишковим є наведення характеристик використаних реактивів в описі методів після того, як їх було ретельно описано у переліку використаних у роботі реактивів.

Для дослідження внутрішньоклітинної локалізації білка KIN10 дисертанткою використано протопласти двох видів рослин, трансформовані генетичною конструкцією з химерним геном (KIN10–BFP або KIN10–RFP). У підрозділі 2.5 розділу «Матеріали і методи» досить детально описано процедуру отримання таких конструкцій та трансформації протопластів. Проте у підрозділі 3.2 розділу «Результати досліджень та їх обговорення» автор починає опис результатів відразу з даних щодо локалізації флуоресцентного сигналу у клітині, не згадуючи частину роботи щодо отримання протопластів з генетичною конструкцією, хоча вона того варта.

На с. 90, обговорюючи високий рівень експресії гена *KIN10* в надземних органах рослин *A. thaliana*, особливо у листках, порівняно з коренем, автор пише, що отримані результати «свідчать про важливу участь протеїнкінази KIN10 у регуляції біосинтетичних та сигнальних процесів, пов’язаних із фотосинтезом та метаболізмом цукрів», проте зв'язок експресії цього гена з власне біосинтетичними та сигнальними процесами в даному експерименті не досліджувався і може висловлюватися лише у вигляді припущення.

У підпису до Рис. 3.11 (С. 94) не описано, з чим порівнювали експресію *KIN10* за впливу трьох типів стресорів; якщо з рівнем у контролі, то

залишається незрозумілим, чому зміни під впливом ПЕГ і NaCl після 8 год не є достовірними.

У підрозділі 3.5 дисертантка пише про зміни кількості та розмірів кореневих волосків у ліній з гіперекспресією та РНК-інтерференцією *KIN10*, що базується лише на фотографіях коренів. Кількісних характеристик не надається, хоча було б бажано.

Автор часто пише про кореляцію певних результатів експериментів між собою. Проте термін «кореляція» правильно використовувати для математично обгрутованих співставлень даних.

Інколи в тексті зустрічаються повтори, стилістичні та граматичні помилки, неточні або невдалі вислови:

- різне написання одного терміну, наприклад «убіхітин» і «убіквітин»;
- англомовний порядок слів, наприклад, «SnRK1 протеїнкінази», «АМФК протеїнкінази»;
- невдалі фрази, що, очевидно, є перекладом з англійських текстів за допомогою перекладача on-line: наприклад, «*саджанці A. thaliana*» замість проростки (38, 42), «конститутивно *виражений* пептид» замість експресований (с. 44);
- невдалі вирази та речення, наприклад, «Протеїнкіназа SNF1 має важливу роль у різних *життєво-чутливих процесах розвитку клітин*» (с. 44); «*показники мітотичного індексу*», хоча мітотичний індекс власне є показником, і очевидно, автор має на увазі значення мітотичного індексу; «пригнічення *рівня* експресії» (с. 98) – мабуть, «пригнічення експресії»; «Відомо, що *саме у листі відбувається широкий спектр біосинтетичних процесів*» (с. 90), але можна з впевненістю сказати, що широкий спектр біосинтетичних процесів відбувається у будь-якому органі рослини.

Вказані недоліки жодним чином не впливають на загальну позитивну оцінку роботи. Дисертаційна робота О.Є. Краснопьорової «Серин-треонінові протеїнкінази SnRK1 (KIN10 та KIN11) *Arabidopsis thaliana*: особливості функціонування та участь в поділі клітин» є самостійною цілісною

завершеною науковою роботою з високим ступенем новизни і з перспективою практичного використання отриманих результатів. Достовірність основних результатів підтверджена відповідними показниками статистичної обробки. Автореферат повністю відображає структуру, основний зміст та висновки дисертації.

За матеріалами дисертації опубліковано 14 наукових праць, з них 8 статей у фахових виданнях. Результати роботи представлялись на багатьох наукових конференціях.

В цілому, дисертаційна робота Краснопьорової Олени Євгенівни за актуальністю, обсягом і змістом повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України 23.07.2013 р. № 567, а її автор, безумовно, заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент
провідний науковий співробітник
відділу клітинної біології та анатомії
Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного
НАН України, д.б.н., с.н.с. Л.Є. Козеко

10 червня 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БОТАНІКИ
ім. М.Г.Холодного
Ідентифікаційний код 05417199
м. КИЇВ

Підпис Козеко Л.Є.
Засвідчую
Відділ кадрів