

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Новожилова Дмитра Олеговича «Пошук Ca^{2+} -залежних протеїнказ, зв'язаних з мікротрубочками рослин, та з'ясування їх ролі у фосфорилуванні тубуліну», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія.

Актуальність проблеми. Взаємодія протеїнказної регуляторної системи із скелетними структурами клітини є мультикомпонентним явищем, що включає як невід'ємну складову безпосереднє фосфорилування α -, β - та γ -тубулінів – основних структурних компонентів мікротрубочок. Наявність на поверхні цих білків багатьох сайтів, по яких може відбуватися фосфорилування за участі різноманітних протеїнказ, дозволяє (клітині) тонко регулювати стабільність певних популяцій мікротрубочок, змінюючи спорідненість різних субодиниць тубуліну між собою та/або до асоційованих білків, що відповідно зсуває константу рівноваги в бік асоціації чи дисоціації. (Іншими словами, будь-яка подія фосфорилування тубуліну буде або стабілізувати, або дестабілізувати мікротрубочки). Серед протеїнказ, здатних модифікувати мікротрубочки, Ca^{2+} -залежні, і зокрема Ca^{2+} -кальмодулін-залежні протеїнкази можуть виявитись критичним компонентом системи їх регуляції, оскільки активований кальцієм кальмодулін сам по собі здатний ефективно взаємодіяти з тубуліном в складі мікротрубочок як тварин, так і рослин, і спричиняти їх деполімеризацію. З огляду на те, що принаймні для протеїнкази $\text{CaMK2}\gamma$ продемонстровано здатність стабілізувати мікротрубочки, саме Ca^{2+} -залежні протеїнкази можуть виявитись тією системою «стримувань і противагів», яка забезпечує захист мікротрубочок від катастрофічної деполімеризації внаслідок різкого підвищення концентрації кальцію в клітині. Таким чином, актуальність роботи Дмитра Олеговича Новожилова, яка присвячена пошуку Ca^{2+} -залежних протеїнказ, пов'язаних з мікротрубочками рослин, та з'ясуванню їх ролі у фосфорилуванні тубуліну, не підлягає жодному сумніву.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконана у відділі геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» в рамках бюджетних науково-дослідних робіт «Геноміка та клітинна біологія цитоскелету рослин як інструмент для вивчення його структури і функцій та розвитку нових біотехнологій» (№ ДР 0115U002084, 2015-2019 рр.), «Біоінформатичні та молекулярно-клітинні

дослідження структури та функцій цитоскелету рослин» (№ ДР 0120U100937, 2020-2024 рр.).

Основні результати, отримані дисертантом, їх наукова новизна та практичне значення.

Результати, отримані здобувачем в ході виконання роботи, розширюють наші уявлення про особливості функціонування кіному рослин і, крім власне наукової цінності та новизни, характеризуються також вираженою прикладною значимістю. Кальцій-зв'язуючі домени досліджуваних протеїнкіназ з різних видів рослин характеризуються більшим рівнем гетерогенності амінокислотних послідовностей порівняно як з їх каталітичними доменами, так і з послідовностями рослинних тубулінів, які фосфорилуються цими кіназами. Відповідно, до цих доменів можуть бути розроблені/знайдені специфічні інгібітори, що опосередковано впливатимуть на цитоскелет бур'янів, не пошкоджуючи мікротрубочки сільськогосподарських культур.

Шляхом аналізу подібності каталітичних доменів рослинних і тваринних протеїнкіназ Дмитром Олеговичем вперше ідентифіковано кальцій-залежні протеїнкінази рослинного походження, здатні регулювати структурно-функціональні властивості цитоскелету. За допомогою процедур кластеризації послідовностей проаналізованих доменів серед кальцій-залежних (СРК) та кальмодулін-залежних (СРК) протеїнкіназ різущки Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) визначені найближчі гомологи тваринних Ca²⁺- кальмодулін-залежних протеїнкіназ типу 2 (CaMK2), рибосомальних S6 кіназ (RSK), кіназ, асоційованих з апоптозом (DAPK) та чекпоінт-кінази 2 (CHK2).

Шляхом аналізу профілів фосфорилування кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин автором вперше ідентифіковано ряд протеїнкіназ *A. thaliana*, здатних фосфорилувати тубуліни. Зокрема, на основі кластеризації 494-х сайтів фосфорилування тваринних протеїнкіназ створені спільні профілі фосфорилування, визначені протеїнкінази, профілям фосфорилування яких відповідають консенсусні послідовності у складі різних ізотипів тубуліну (кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа типу 1А (CaMK1A), кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа типу 2А (CaMK2A), кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа кіназа 2 (CaMKK2) людини та кальцій-/кальмодулін-залежна протеїнкіназа типу 2А (CaMK2A) щура) та відповідно, виявлені їх найближчі гомологи серед протеїнкіназ різущки Таля, а саме - кальцій-залежна протеїнкіназа 20 (СРК20), кальцій-

залежна протеїнкіназа 21 (CPK21) та кіназа взаємодії з гемінівірусним Rep 2 (GRIK2).

На поверхні β - та γ -субодиниць тубуліну *A. thaliana* автором вперше ідентифіковані потенційні сайти фосфорилування кальцій-залежними протеїнкіназами: Thr312 – у випадку β -тубуліну, Ser32, Ser259, Ser321 та Ser376 – у випадку γ -тубуліну. Оскільки треонін-312 розташовується поблизу інтрадимерного контактного інтерфейсу, його фосфорилування з високою імовірністю здатне впливати на його стабільність.

Також вперше досліджено можливість використання відомих KN-93 та KN-62 інгібіторів протеїнкіназ CaMK2 людини як регуляторів активності рослинних протеїнкіназ CDPK та визначений потенційний сайт зв'язування цих сполук інгібіторів в структурі кальцій-зв'язуючого домену CPK1 *A. thaliana*. На основі даних молекулярного докінгу KN-93 та KN-62 в ідентифікований сайт Дмитром Олеговичем підтверджено можливість використання цих інгібіторів у дослідженні кальцій-залежних протеїнкіназ у рослин.

Отримані дані можуть бути використані як в подальших дослідженнях, зокрема, для вивчення особливостей функціонування і регуляції мікротрубочок рослин цитоскелету та сигнальних каскадів, опосередкованих протеїнкіназами CDPK, що включають структурні перебудови та динамічні зміни мікротрубочок, так і для дизайну/пошуку нових засобів захисту рослин, які матимуть селективну афінність до кальцій-залежних протеїнкіназ бур'янів.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій сформульованих у дисертації.

В ході роботи автором надзвичайно ретельно і вичерпно відібрано кальцій-залежні протеїнкінази людини та миші, що беруть участь у регуляції цитоскелету, які були використані як референсні для пошуку відповідних кіназ рослинного походження. При створенні вибірки були враховані не лише кальмодулін-залежні протеїнкінази, здатні фосфорилувати мікротрубочки, а і ті, що беруть участь у регуляції актинового і тубулінового цитоскелету або опосередковано, або механізм їх дії не вивчений досконало. Кластерний аналіз каталітичних доменів кальцій-залежних протеїнкіназ тварин і рослин проводився як для повної виборки досліджуваних послідовностей, так за допомогою ітеративних процедур, що включали індивідуальне вирівнювання послідовностей окремих рослинних протеїнкіназ проти загальної вибірки референсних послідовностей тваринних кальцій-залежних протеїнкіназ.

Профілі фосфорилування для кальцій-залежних протеїніназ визначалися на основі виборки з 494 послідовностей з наступним кластерним аналізом і ітеративним створенням профілей, що відповідали окремим кладам 1 і 2 порядку, з перевіркою на кожному етапі. Для остаточного підтвердження еволюційної спорідненості тваринних кальцієвих кіназ і рослинних протеїніназ CDPK було використано крос-валідацію - зворотній пошук тваринних гомологів для кальцій-залежних протеїніназ рослин CPK20, CPK21 та GRIK2, ідентифікованих як такі, що здатні фосфорилувати молекули тубуліну. Реконструкція просторової структури тубулінів та їх комплексів проводилася з використанням альтернативних сервісів, якість просторої структури отриманих моделей оцінювалася за допомогою інструментів, які є зальноприйнятим стандартом в такого роду дослідженнях. Всього автором при виконанні дисертаційних досліджень було використано 28 різних інструментів.

Викладені міркування є основою для твердження, що положення і висновки, винесені на захист, є обґрунтованими і достовірними. Основні положення і результати проведених досліджень сформульовані у 8 висновках, що логічно витікають з отриманих здобувачем експериментальних даних. Особливою родзинкою роботи є розділ «Узагальнення», який не просто узагальнює результати, а фактично є своєрідною «дисертацією в мініатюрі» дає цілісне уявлення про суть виконаного автором дослідження.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях. Результати досліджень, представлені в дисертаційній роботі, повністю викладені в опублікованих роботах. За результатами дисертації опубліковано 4 статті у фахових наукових виданнях, з яких 2 – належать до видання з категорії А та 1 тези доповіді в збірнику матеріалів конференції.

Зауваження щодо змісту та оформлення дисертації.

Представлена до захисту дисертаційна робота є оригінальним науковим дослідженням, що, як зазначалося вище, суттєво розширюють наші уявлення про особливості функціонування кіному рослин. Однак в плані побажань для подальшої наукової роботи слід зробити деякі зауваження:

стор. 64 – Розділ 2.1 згідно його наповнення краще було б назвати «Об'єкти та інструменти досліджень», дати відповідні посилання на таблиці 2.1-2.3 та перенести туди вміст підрозділу 2.1.1;

стор. 67 – зміст підрозділу 2.1.1 не відповідає його назві;

стор. 69 і далі – повторні посилання на джерела, де описуються інструменти, що використовуються в роботі, наводити не треба;

стор. 79-82 – автор описує результати аналізу доменної архітектури ряду протеїназ, проте не наводить відповідні графічні схеми, подібні до представлених на рис. 3.1. Наявність таких схем значно б покращила сприйняття матеріалу;

стор. 79 – рис. 3.1 є недостатньо якісним, числові значення, приведені на ньому, практично нечитабельні;

стор. 92-96 – списки сайтів фосфорилювання бажано було б навести у вигляді таблиць;

стор. 97 – бажано було б детально описати процедуру кластеризації і створення профілів окремих клад;

стор. 111 – на загалом якісному рисунку 4.3 треонін-312 виглядає таким чином, ніби належить до α -, а не до β -тубуліну. Автору також варто було проаналізувати амінокислотне мікрооточення цього залишка. Цілком імовірно, що це дало б можливість досить точно спрогнозувати наслідки фосфорилювання в цьому сайті;

стор. 117 – в роботі не наведено ні структурну формулу, ні просторову структуру мелбранкаміду. На рис. 5.3 наведено лише топологію невідомої речовини, що може відповідати в тому числі і молекулі мелбранкаміду;

стор. 118 – аналогічне зауваження стосовно сполук KN-62 і KN-93 - не наведені формули речовин. Так само в роботі не наведено амінокислотний склад сайтів зв'язування цих сполук на поверхні протеїназ. Залишається здогадуватись, що вони можуть містити залишки, представлені на рис. 5.2;

стор. 118, 119 – в тексті наводяться значення оціночних функцій програмного забезпечення Gold для досліджуваних комплексів, проте ці функції ніяк не розшифровуються (не наведені ні складові, ні розмірність цих функцій);

Також по тексту зустрічаються різні варіанти написання методу кластеризації (NJ та N-J), латинські назви видів не завжди наведені курсивом;

Крім того в тексті зустрічаються граматичні помилки і описки. Зокрема, на стор. 62, 78 – цікаві граматичні помилки в термінах «інгіботорів» замість «інгібіторів», «автоінгіботорної» замість автоінгібіторної».

Водночас слід зазначити, що наведені зауваження ні в якій мірі не знижують наукової цінності дисертації. Робота Дмитра Олеговича написана гарною літературною мовою і дуже легко читається. Коли читаєш цей текст, то складається відчуття легкого потоку думок, які досить плавно і логічно перетікають одна в одну, що як правило, характеризує гарні науково-популярні тексти. З іншого боку, це досить якісний науковий текст, що справляє враження цілісності і завершеності. Основний зміст автореферату

повністю відповідає основним положенням дисертації.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Новожилова Дмитра Олеговича, «Пошук Ca^{2+} -залежних протеїназ, зв'язаних з мікротрубочками рослин, та з'ясування їх ролі у фосфорилуванні тубуліну», є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів, глибиною розкриття поставлених проблем, логічністю і обґрунтованістю висновків дисертація повністю відповідає вимогам п.п. 9, 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», що висуваються до дисертаційних робіт, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013. №567, а її автор Новожилов Дмитро Олегович заслуговує на присудження йому вченого ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія.

Завідувач кафедри
молекулярної біотехнології та біоінформатики
Інституту високих технологій
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
кандидат біологічних наук, доцент

О. Ю. Нипорко

