

ВІДГУК

на дисертаційну роботу Новожилова Дмитра Олеговича «Пошук Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ, 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.
(091 – біологія)

Актуальність теми. Дисертаційна робота Новожилова Дмитра Олеговича «Пошук Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ, зв'язаних з мікротрубочками рослин, та з'ясування їх ролі у фосфорилуванні тубуліну» присвячена вирішенню актуальної наукової проблеми - вивченню ролі Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ у регуляції мікротрубочок рослин. У рослин кальцій виступає ключовим вторинним посередником у низці сигнальних каскадів, що включають у себе, зокрема, фосфорилування білків цитоскелету. Основні компоненти мікротрубочок – тубуліни піддаються фосфорилуванню, результатом чого є зміни у тубулін-тубулінових взаємодіях, взаємодіях тубулінів з іншими білками, асоційованими з мікротрубочками та, загалом, зміни у структурно-динамічних властивостях мікротрубочок. На сьогоднішній день добре вивчена низка кальцій- та кальцій/кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин, що безпосередньо фосфорилують тубуліновий цитоскелет. Проте, роль кальцієвих сенсорів рослинного походження вивчена недостатньо. Зважаючи на важливість кальцієвого сигналіну для рослинної клітини, вивчення шляхів кальцій-опосередкованої регуляції мікротрубочок кальцій-залежними протеїнкіназами лежить в площині актуальних проблем сучасної біології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у відділі геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» (ДУ «ІХБГ 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 pp.), «Біоінформатичні та молекулярно-клітинні дослідження структури та функцій цитоскелету рослин» (№ ДР 0120U100937, 2020-2024 pp.).

Наукова новизна одержаних результатів. Новизна отриманих результатів полягає в тому, що вперше з'ясовані конкретні представники протеїнкіназ підродин CDPK і CRK, які потенційно можуть брати участь у регуляції тубулінового цитоскелету на основі подібності амінокислотних послідовностей їх каталітичних доменів до тваринних гомологів, що регулюються кальцієм і залучені до регуляції мікротрубочок. На основі аналізу профілів фосфорилування кальцій/кальмодулін-залежних протеїнкіназ тварин вперше спрогнозована можливість безпосереднього фосфорилування тубуліну рослинними кальцій-залежними протеїнкіназами CPK20 і CPK21 з *Arabidopsis thaliana*. Визначено низку потенційних сайтів фосфорилування на поверхні тубулінів та зроблені припущення щодо ролі фосфорилування визначених залишків. Дисертантом вперше проаналізовано доцільність використання відомих, спрямованих щодо кальмодуліну, інгібіторів CaMK2 для вивчення рослинних протеїнкіназ підродини CDPK. За допомогою молекулярного докінгу доведено, що кальмодулін-таргетовані інгібітори протеїнкінази CaMK2 – KN-93 та KN-62 – мають гомологічні й енергетично вигідні сайти зв'язування у структурах кальмодуліну людини та кальцій-залежної протеїнкінази арабідопсису.

Практичне значення результатів досліджень. Проблема, яку досліджує дисертант, є актуальною, а одержані дані вносять вагомий вклад у розуміння кальцій-залежних сигнальних шляхів у рослинній клітині. Отримані результати є важливими для вивчення ролі кальцій-залежних протеїнкіназ підродини CDPK у регуляції тубулінового цитоскелету та, загалом, вивчення особливостей функціонування і регуляції мікротрубочок рослин. Запропоноване використання сполук KN-93 і KN-62 як потенційних інгібіторів рослинних протеїнкіназ

CDPK, які можуть бути використані для подальшого експериментального вивчення особливостей функціонування протеїназ CDPK у рослин.

Ступінь обґрунтованості основних наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації. У роботі використані методи класичної та структурної біоінформатики, методи попарного і множинного вирівнювання, профільного та кладистичного аналізу, тривимірного моделювання, молекулярного докінгу. Вибір ідеї, обґрунтоване планування, володіння різними сучасними методами класичної і структурної біоінформатики дозволили дисертанту виконати всі поставлені завдання і одержати оригінальні результати. Зроблені автором висновки логічно випливають з одержаних результатів та відображають головні досягнення проведеної роботи та перспективи використання отриманих даних.

Результати досліджень дисертанта, основні наукові положення дисертації, її висновки є цілком обґрунтованими, мають значне теоретичне і практичне значення. Автореферат відображує зміст дисертації.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. За темою дисертації опубліковано 5 наукових праць, з них 4 статті у профільних виданнях та 1 тези доповіді у збірнику матеріалів конференції.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем, спільно з науковим керівником, було обрано тему наукового дослідження, сформульовано основну мету і завдання роботи, інтерпретовано отримані результати, розроблено структуру і план дисертаційної роботи та підготовлено публікації. Здобувачем особисто опрацьовані літературні джерела за темою дисертації, проведені експериментальні дослідження та викладено основні положення дисертаційної роботи.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 177 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і

методів досліджень, результатів досліджень, їх аналізу та обговорення, висновків, списку використаних джерел, який містить 264 посилання. Дисертаційна робота містить 12 рисунків, 4 таблиці, 2 додатки.

У розділі «**Вступ**» висвітлено актуальність теми, мету та завдання роботи, зв'язок з науковими темами, об'єкт і предмет роботи, охарактеризовані методи досліджень, наукова новизна та практичне значення, розкрито особистий внесок автора та апробацію результатів роботи.

У **літературному огляді**, що представлений розділом «Роль Ca^{2+} -залежних протеїніназ у регуляції мікротрубочок», висвітлено основні уявлення щодо структури, ролі та функції мікротрубочок, розглянуті особливості структурної організації мікротрубочок у тварин і рослин, охарактеризовані посттрансляційні модифікації тубуліну та їх роль. Розглянута функціональна роль Ca^{2+} - та Ca^{2+} /кальмодулін-залежних протеїніназ тварин і рослин, їх класифікація. Особливу увагу зосереджено на участі цих протеїніназ у регуляції мікротрубочок. Також розглядаються різні типи інгібіторів протеїнінази CaMK2. Підсумовуючи оглядовий розділ, дисертант обґрунтовує проблему та актуальність досліджень ролі кальцій-залежних протеїніназ рослин.

У **розділі 2** детально описані матеріали і методи досліджень. Наведені використані у ході роботи біоінформаційні інструменти, програми і програмні пакети, бази даних, матеріали яких були використані, наведені ідентифікатори послідовностей та структур, використаних у роботі. Описані біоінформаційні методи для пошуку і відбору амінокислотних послідовностей, аналізу доменної архітектури та структури досліджуваних білків. Наведені кладистичні методи, що були використані у дослідженні, описаний алгоритм проведення профільного аналізу сайтів фосфорилування тваринних кальцій/кальмодулін-залежних протеїніназ та визначення кальцій-залежних протеїніназ *A. thaliana*, здатних фосфорилувати тубулін. Охарактеризована методика підбору

нокаутних мутантів CDPK *A. thaliana*. Описані методи тривимірного моделювання та молекулярного докінгу.

Результати досліджень дисертанта викладено у трьох наступних розділах. У **розділі 3** наведено результати пошуку кальцій- та кальцій/кальмодулін-залежних протеїнкіназ *A. thaliana*, здатних регулювати мікротрубочки та безпосередньо фосфорилувати тубулін. Дисертантом була сформована вибірка протеїнкіназ тварин, що регулюються кальцієм і регулюють тубуліновий цитоскелет, та протеїнкіназ підродин CDPK і CRK з *A. thaliana*. Була проведена серія з 42 вирівнювань послідовностей кожної окремої CDPK і CRK проти вибірки тваринних кіназ. За допомогою N-J кластеризації послідовностей каталітичних доменів даних протеїнкіназ були ідентифіковані найближчі гомологи між тваринними кальмодулін-залежними кіназами, що регулюють цитоскелет та протеїнкіназами CDPK і CRK-кіназами *A. thaliana*.

Для визначення рослинних кальцій-залежних протеїнкіназ, здатних безпосередньо фосфорилувати цитоскелет, був проведений аналіз на основі створення спільних профілів сайтів фосфорилування тваринних кальцій/кальмодулін-залежних протеїнкіназ. Були визначені клади різного порядку, що поєднують схожі сайти фосфорилування і асоційовані з ними протеїнкінази ссавців, відібрані профілі, яким відповідають консенсусні послідовності у складі тубулінів *A. thaliana*. Визначено, що потенційні сайти для фосфорилування, що виявлені послідовностях тубулінів *A. thaliana* мають найбільшу подібність до сайтів, що фосфорилують тваринні протеїнкінази CaMK1A і CaMK2A *H. sapiens*, CaMK2A *R. norvegicus*, а також CaMKK2 з *H. sapiens*. Визначені їх найближчі гомологи серед протеїнкіназ *A. thaliana* - CPK20, CPK21 та GRIK2 відповідно. CPK20 і CPK21 були визначені як представники кальцій-залежних протеїнкіназ підродини CDPK, потенційно здатних фосфорилувати тубулін.

У розділі 4 представлені результати пошуку ймовірних сайтів фосфорилування тубуліну на основі порівняння з НММ-профілями сайтів фосфорилування, специфічних для тваринних протеїнкіназ СаМК2 та визначенні їх просторової доступності для модифікації на просторових моделях фрагменту центру первинної нуклеації мікротрубочок та димеру α/β тубуліну. Ser32, Ser259, Ser321 та Ser376 визначені, як доступні потенційні сайти фосфорилування γ -тубуліну, а Thr312 – як потенційний сайт фосфорилування β -тубуліну. Виходячи з локалізації визначених сайтів фосфорилування висунуте припущення щодо їх можливої участі у формуванні центру первинної нуклеації мікротрубочок та димеру α/β тубуліну.

Розділ 5 присвячений аналізу перспективних інструментів для подальшого вивчення рослинних протеїнкіназ підродини СДПК. Проведений відбір найбільш перспективні для досліджень функціональної ролі протеїнкіназ СРК20 та СРК21 нокаутних мутантів *A. thaliana*. Переверене припущення щодо можливості використання відомих кальмодулін-спрямованих інгібіторів протеїнкінази СаМК2 для пригнічення активності рослинних протеїнкіназ підродини СДПК. Показана наявність просторово гомологічних ділянок у структурі тваринного кальмодуліну та Ca^{2+} -зв'язуючого домену СРК1 з *A. thaliana*, показана подібність амінокислотного оточення потенційного сайту зв'язування. Шляхом молекулярного докінгу показана наявність енергетично вигідних гомологічних сайтів зв'язування KN-93 та KN-62 у структурах кальмодуліну людини та СРК1 з *A. thaliana*. Запропоноване використання цих інгібіторів для вивчення рослинних протеїнкіназ СДПК.

Узагальнення результатів досліджень викладене на 8 сторінках та складає розділ 6. Зміст розділу лаконічно і вдало узагальнює і підсумовує основні результати, отримані в роботі.

Робота завершується 8 висновками, які відображають основні наукові положення дисертації. Висновки є обґрунтованими, логічними, у повному

обсязі розкривають сутність результатів роботи та відповідають завданням, поставленим дисертантом для реалізації мети досліджень.

Загалом, дисертаційне дослідження Д.О. Новожилова є актуальним, демонструє значний обсяг проведених досліджень, виконана з використанням різноманітних методів сучасної класичної і структурної біоінформатики і має значний потенціал для подальших перспективних досліджень.

Зауваження щодо змісту та оформленню дисертації.

Робота містить деякі недоліки.

1. У дисертації та авторефераті зустрічаються граматичні та стилістичні помилки, неточні терміни (напр. – убіхітинування).
2. Здобувач не уніфікує використання деяких скорочень та аббревіатур. Так, аббревіатура для методу поєднання сусідів у роботі використовується у двох варіантах «NJ» та «N-J». Білки γ -тубулінового комплексу GCP2 (SPC97) та GCP3 (SPC98) у огляді літератури позначені, як GCP2 і GCP3, у розділі 4 – як SPC97 і SPC98, а на ілюстраціях до розділу 4 – як GCP2 і GCP3.
3. Бажано було б внести у список більше посилань за останні роки. Особливо це стосується оглядових робіт.
4. Рисунок 3.5 включає велику кількість дрібних символів, які неможливо розрізнити. Краще його було б розташувати вздовж сторінки.
5. Як пояснити, що в результаті 4 виступів на конференціях опубліковані лише 1 тези?
6. Активація RSK-кіназ (p90 ribosomal S6 kinase) включає кілька послідовних етапів фосфорилування, ініційованих ERK1/2 та PDK1. RSK фосфорилує CREB, c-Fos, I κ B, Bad, C/EBP β , Myt1, гістон H3. CHK2 активується АТМ, ДНК-залежною протеїнкіназою та Polo-like кіназою-3. CHK2 контролює клітинний цикл у відповідь на стреси (напр. пошкодження ДНК). Ці кінази, та кінази, що їх активують не залежать від кальцію/кальмодуліну і практично не

пов'язані з модуляцією тубуліну. Що спонукало вас шукати їх спорідненість з рослинними кальцій/кальмодулін-залежними рослинними кіназами?

Незважаючи на зауваження, наведені недоліки не применшують наукову цінність роботи та не впливають на позитивну оцінку роботи.

Дисертаційна робота Новожилова Дмитра Олеговича «Пошук Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ, зв'язаних з мікротрубочками рослин, та з'ясування їх ролі у фосфорилуванні тубуліну» є закінченою науково-дослідною роботою, що за актуальністю, науковою новизною, обсягом і змістом проведених досліджень та обґрунтованістю висновків повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України 24.07.2013 р. № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія (091 – біологія).

Головний наук. співр. відділу фундаментальних та прикладних проблем ендокринології
ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»,
доктор біол. наук, ст. наук. співр.

В.М. Пушкарьов

