

## 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.**

Відомо що головними факторами модуляції функціональної пластичності мікротрубочок виступають експресія різних ізотипів тубуліну, а також різноманітні посттрансляційні модифікації. Регуляторний механізм, що лежить в основі такої функціональної пластичності мікротрубочок саме і отримав назву «тубуліновий код».

Дисертаційна робота Карпова Павла Андрійовича присвячена вирішенню надзвичайно складної і актуальної наукової проблеми - визначення протеїнкіназ рослинного походження, що безпосередньо причетні до фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну, ідентифікації сайтів фосфорилування цих білків та з'ясуванню наслідків зазначеного типу посттрансляційних модифікації у формуванні тубулінового коду вищих рослин.

Фосфорилування, є одним з найбільш поширених і важливих типів посттрансляційних модифікацій. У випадку мікротрубочок, ензиматичне фосфорилування обумовлює конформаційні зміни цільових білків, впливає на властивості молекулярних інтерфейсів, динамічну нестабільність мікротрубочок, впливає на взаємодію з асоційованими білками, забезпечує регуляцію активного транспорту за участю моторних білків та ін. Незважаючи на значний прогрес у розумінні більшості фундаментальних аспектів фосфорилування тубуліну у тварин і дріжджів, визначення протеїнкіназ, сайтів і функціональної ролі більшості модифікацій у вищих рослин і досі залишається обмеженим.

В межах запланованого дослідження перед автором стояла складна задача визначення основних шляхів фосфорилування тубуліну рослин як одного з критичних факторів функціональної спеціалізації мікротрубочок, визначити коло протеїнкіназ, здатних безпосередньо фосфорилувати  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубулін,

ідентифікувати сайти такого фосфорилювання та обґрунтувати роль визначених протеїніназ як регуляторів тубулінового коду вищих рослин.

Слід зазначити, що для  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну тварин і дріжджів існування численних сайтів фосфорилювання було підтверджено експериментально. При цьому більшість функціонально-важливих сайтів фосфорилювання молекул тубуліну у тварин і рослин зберегли консервативність і первинне функціональне значення. В той же час, не викликає сумніву і більш складна організація рослинних кіномів, а також існування певних структурних відмінностей рослинних і тваринних протеїніназ. Проте, як засвідчило дисертаційне дослідження, більша частина протеїніназ, що контролюють клітинний цикл і систему мікротрубочок у *Homo sapiens* і *Arabidopsis thaliana*, виявляють помітну консервативність на рівні каталітичних доменів. Взаємна консервативність молекул тубуліну і протеїніназ тубулінового коду, дозволили автору застосувати методи біоінформатичного визначення консервативних сайтів фосфорилювання молекул  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну і ідентифікувати відповідні рослинні протеїнінази. Вдале поєднання біоінформатичних і традиційних лабораторних методів створили потужний тандем для ефективного визначення сайтів і протеїніназ тубулінового коду вищих рослин.

Таким чином, актуальність, мета дослідження і методологічне вирішення поставленої дисертантом задачі не викликають жодних сумнівів.

**Структура роботи та обсяг.** Дисертаційна робота Карпова П.А. має класичну структуру і складається з вступу, огляду літератури (Розділи 1 і 2), матеріалів і методів (Розділ 3), експериментальної частини (Розділи 4-9), списку використаної літератури, що налічує понад 600 джерел, а також 8 додатків. У Розділі 9 експериментальної частини, узагальнено і проаналізовано отримані результати. Загальний об'єм дисертації складає 545 сторінок. Робота прекрасно ілюстрована - рукопис містить 21 таблицю і 132 рисунка.

**Вступ** містить інформацію, що обґрунтовує актуальність обраної Карповим П.А. теми, відображає зв'язок роботи з науковими програмами, містить мету, завдання та методи дослідження. Визначено предмет і об'єкт дослідження, сформульовано наукову новизну одержаних результатів та їх

практичне значення, особистий внесок дисертанта. Результати дисертації широко доповідались на численних (38 тез) вітчизняних та міжнародних з'їздах і конференціях.

**«Огляд літератури»** дисертації складається з двох підрозділів. У 1 підрозділі, на підставі аналізу даних літератури, автор характеризує сучасний стан досліджень щодо процесу фосфорилування, як ключового посттрансляційного фактора модуляції тубулінового коду, надає опис відомих сайтів фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну, наводить оцінку міжвидової консервативності відомих сайтів зворотного фосфорилування. У 2 підрозділі дисертантом презентований огляд основних родин протеїнкіназ, для яких існує інформація стосовно причетності до безпосереднього фосфорилування молекул тубуліну. Окремі розділи присвячено представникам суперродини AGC, суперродини CMGC і близької до CMGC протеїнкінази CK2, а також протеїнкіназам суперродини CDPK-SnRK. Наведений автором аналіз літератури охоплює значний пласт інформації (про що свідчить і кількість посилань), підтверджує актуальність теми дослідження, а також логічно обґрунтовує наступні завдання досліджень.

**«Матеріали і методи дослідження»** (Розділ 3) містять повний опис аспектів біоінформатичного і лабораторного дослідження. Наведено програмні інструменти і методи визначення сайтів специфічного фосфорилування, структурно-біологічних досліджень, роботи з базами даних, методів реконструкції просторової структури білків, лігандів, відтворення ліганд-білкових і білок-білкових комплексів, застосування аналізу структурної топології і молекулярної динаміки. Автор надає детальну інформацію стосовно використаних методів лабораторного дослідження ролі рослинних протеїнкіназ в регуляції структурно-функціонального стану системи мікротрубочок вищих рослин. Загалом, під час виконання дисертаційної роботи, було застосовано методи генетичного клонування, мікроскопічного дослідження флуоресцентних конструктів, специфічного інгібування цільових протеїнкіназ, мутантні лінії рослин, фізіологічні експерименти тощо.

**Результати оригінальних досліджень та їх обговорення** здобувач надає у шести окремих розділах. Перший з яких - Розділ 4 охоплює результати первинного біоінформатичного пошуку. Представлені дані масштабної анотації повного кіному модельної рослини *A. thaliana*. Автором визначено групу протеїнкіназ, пов'язаних з регуляцією цитоскелету і фосфорилуванням тубуліну у тварин, і, на підставі їх спільності, визначено групу ймовірних рослинних гомологів. Наступні розділи, 5 – 8, присвячено комплексному біоінформаційному і експериментальному дослідженню пріоритетних груп протеїнкіназ, що, згідно первинному пошуку, були визначені як потенційні агенти тубулінового коду вищих рослин.

Кожна з глав охоплює окрему суперродину, або родину рослинних протеїнкіназ. Таким чином, зазначені глави містять результати досліджень рослинних представників: суперродини AGC (Розділ 5), суперродини CMGC і близької до CMGC родини SK2 (Розділ 6), родини SK1 і споріднених до SK1 протеїнкіназ BUB1 (Розділ 7), а також найбільшій суперродини CDPK-SnRK (Розділ 8), що об'єднує  $Ca^{2+}$ -залежні протеїнкінази і Snf-споріднені протеїнкінази. До кожної з груп автор застосував індивідуальний методологічний підхід, що включав методи біоінформатики, структурної біології, молекулярно-генетичного і фізіологічного експерименту, використання сучасної мікроскопії, мутантних і трансгенних експериментальних моделей.

Як видно з даних аналізу дисертаційної роботи, Карпову П.А. вдалося визначити основні шляхи ензиматичного фосфорилування тубуліну рослин за участю різних типів протеїнкіназ. Автором надано докази, що дозволяють позиціонувати фосфорилування як один з ключових факторів функціональної спеціалізації мікротрубочок. Визначено коло протеїнкіназ, здатних безпосередньо фосфорилувати молекули  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну, ідентифіковано сайти такого фосфорилування та надано структурно-біологічне і експериментальне обґрунтування ролі визначених протеїнкіназ в регуляції тубулінового коду вищих рослин. Так, Карповим П.А. встановлено, що у фосфорилуванні  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну вищих рослин беруть участь три

протеїнкінази групи AGC (IREN1, КРК1 і КРК2), дві протеїнкінази групи CMGC (CDK1 і YAK1) і філогенетично близький гетеротетрамерний холоензим СК2, ізотип СКЛ6 казеїнкінази 1, SNF1-споріднені протеїнкінази KIN10 і KIN11, NIMA-протеїнкіназа NEK6 і дев'ять  $Ca^{2+}$ -залежних протеїнкіназ: п'ять представників родини СРК (СРК7, СРК14, СРК20, СРК21, СРК32), три представника родини CDPK/CRK (CRK2/CAMK2, CRK3/CAMK3, CRK8/CAMK8) і SnAK1-кіназа GRIK2.

У останньому 9 розділі, автор аналізує та узагальнює результати дисертаційного дослідження.

За результатами дослідження здобувачем запропонована найбільш повна і узагальнююча модель впливу фосфорилування на регуляцію структури і властивостей макромолекулярних комплексів  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну вищих рослин, що реалізується шляхом безпосередньої модуляції тубулінового коду. Надана оцінка участі кожної з зазначених протеїнкіназ і структурно-біологічне обґрунтування ролі окремих модифікацій тубуліну.

**Список літературних джерел** дисертаційної роботи складає 637 посилань.

**Обґрунтованість і достовірність наукових результатів і висновків.**

Вважаю що застосовані під час виконання дисертаційної роботи лабораторні методи підібрані адекватно і відповідають поставленим задачам.

Отримані дані дисертації узагальнюються автором у вигляді 17 висновків, які на мій погляд логічні і гармонічно впливають з результатів виконаних досліджень.

**Науково-практична значимість роботи.** Вважаю, що отримані Карповим П.А. результати суттєво розширюють наше уявлення щодо ролі фосфорилування і окремих протеїнкіназ у формуванні функціональної спеціалізації мікротрубочок рослин через безпосереднє фосфорилування молекул  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну. Визначені автором ферменти і асоційовані з ними сайти фосфорилування тубуліну значно розширюють перелік молекулярних мішеней і можливих механізмів впливу на процеси, безпосередньо пов'язані з функціональним станом тубулінового цитоскелету. Це утворює теоретичний фундамент для розуміння зв'язку зовнішніх і внутрішніх чинників, сигнальних

каскадів і перебудов системи мікротрубочок. Таким чином, вважаю, що визначення протеїніназ тубулінового коду має не лише фундаментальне значення, але і відкриває новий етап залучення зазначених протеїніназ як перспективних молекулярних мішеней нових інноваційних технологій.

**Повнота викладення основних результатів досліджень у наукових фахових виданнях.** За результатами дисертаційної роботи було оприлюднене 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.

### **Зауваження щодо змісту та оформлення рукопису дисертації.**

Робота містить і деякі недоліки та упущення.

1. Здобувач дуже часто використовує слово «група» у випадках коли б, на мою думку, більш доцільно було б використовувати термін «суперродина».

2. Філогенетична реконструкція кіному модельної рослини *Arabidopsis thaliana* вже здійснювалась раніше іншими авторами. Що зумовило необхідність повторного дослідження, чи є якісь переваги у даної реконструкції і якщо так, чому побудоване древо кіному поступається даним інших дослідників за кількістю протеїніназ?

3. В доповнення до попереднього питання. Під час актуального дослідження була виконана не лише реконструкція повного кіному *Arabidopsis thaliana*, але також, створена локальна база послідовностей зазначених протеїніназ і їх каталітичних доменів. Чи є практична сторона використання створених бібліотек і в якому напрямку це можливо.

4. У тварин, протеїнінази СК1 і ВUB1 (BRK1) мають значні відмінності доменної архітектури та функції і навіть не позиціонуються як функціональні гомологи. Чим було зумовлено їх об'єднання в спільний розділ?

5. Застосовані автором методичні підходи, засвідчили можливість пошуку рослинних протеїніназ тубулінового коду спираючись на їх структурну подібність. Чи є можливим зворотний пошук? Тобто, чи можливо застосування результатів дослідження кіному тубулінового коду рослин як модель, яку можливо екстраполювати на певні онко- та нейродегенеративні патології людини?

6. Чи існує у рослин механізм контролю регуляції функції білка шляхом цис/транс ізомеризації по мотиву фосфо-Ser/Thr-Pro після фосфорилювання, як це має місце у тварин (наприклад, за допомогою пептидил-проліл цис/транс-ізомерази Pin 1)?

7. Чи використовує автор для обчислення і презентації наукових даних ліцензійні програми?

8. Чому джерелом РНК для клонування кДНК каталітичного домену рослинної GMLK було вибрано листя винограду?

9. Бажано було б внести у список більше посилань за останні роки.

10. По тексту дисертації зустрічаються окремі друкарські помилки, повтори і невдалі фрази.

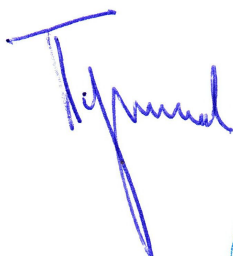
Незважаючи на зауваження, вважаю, що наведені недоліки не знижують цінність представленої дисертаційної роботи, у більшості випадків мають технічний, або рекомендаційний характер і не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

За результатами аналізу рукописів дисертації і автореферату Карпова Павла Андрійовича, підтверджую, що виконана робота є оригінальним і завершеним дослідженням. Представлена до захисту дисертація виконана на сучасному методичному рівні, має високе наукове та практичне значення, що підтверджується відповідними публікаціями. Автор вдало поєднав сучасні біоінформаційні і лабораторні методи, проявив аналітичний і критичний підхід під час аналізу і інтерпретації даних, а зроблені висновки обґрунтовані і логічні. Дисертація характеризується інформативним представленням великих

масивів даних, значною кількістю оригінальних авторських ілюстрацій, що позитивно позначається на сприйнятті представленого матеріалу.

На підставі всього вищезазначеного, 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, науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів 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).

Головний науковий співробітник  
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

