

Відгук

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Самофалової Дарії Олексіївни

«Реконструкція просторової структури протеїнфосфатаз, задіяних в регуляції цитоскелету у рослин, та структурно-біологічні механізми їх взаємодії зі специфічними інгібіторами»

представленої до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Сучасний етап розвитку біології характеризується інтенсивним розвитком біоінформатики або біології *in silico*, яка є одним з найбільш перспективних напрямків структурно-функціональних досліджень білків. Структурна біоінформатика використовує методи комп'ютерного аналізу для моделювання просторової структури білків і складних макромолекулярних комплексів, аналізу механізмів молекулярного впізнавання, динаміки макромолекул та її ролі в процесах впізнавання, віртуального скринінгу біологічно активних речовин. Кінцевою метою структурної біоінформатики є створення селективних модуляторів функціональної активності біополімерів, в тому числі нових прототипів лікарських препаратів (drug design).

Актуальність теми дисертаційної роботи. Тема дисертаційної роботи Самофалової Д.О. безумовно є актуальною, оскільки просторова структура протеїнфосфатаз рослин до цього часу не встановлена експериментальними методами рентгеноструктурного аналізу чи методами ЯМР-спектроскопії. Це в свою чергу затруднює і обмежує вивчення структурної організації центрів зв'язування та молекулярних механізмів дії інгібіторів цих ферментів. Отже, практично єдиною можливістю залишається вивчення особливостей структури цих білків методами структурної біоінформатики.

Дисертаційна робота Самофалової Д.О. присвячена вивченню протеїнфосфатаз різного еволюційного походження, які беруть участь у регуляції мікротрубочкового цитоскелету та структурним особливостям їх взаємодії зі специфічними інгібіторами. Відповідно, **метою роботи було** провести пошук і біоінформаційне дослідження протеїнфосфатаз рослин, що впливають на структуру і функціонування мікротрубочок, реконструкція їх просторової структури та визначення структурних механізмів специфічності їх взаємодії з різними групами інгібіторів. Високий ступінь гомології з тваринними протеїнфосфатазами дозволяє ефективно проведення біоінформатичних досліджень структури рослинних протеїнфосфатаз, оскільки для тваринних протеїнфосфатаз визначена тривимірна просторова структура в кристалі. Такий рівень гомології амінокислотних послідовностей дозволяє

проводити моделювання структури цільового білка, використовуючи структуру білка-матриці. Точність структур, отриманих методами моделювання за гомологією, може конкурувати з точністю експериментально визначених структур.

Для втілення поставленої задачі здобувачу було необхідно вирішити ряд питань, а саме: реконструювати повні фосфатоми вищих рослин і тварин та визначити їх відмінності; визначити протеїнфосфатази, пов'язані з регуляцією структури і функцій мікротрубочок рослин та реконструювати їх просторові структури; встановити структурні механізми ліганд-білкової взаємодії та реконструювати комплекси рослинних протеїнфосфатаз з відомими інгібіторами, верифікувавши їх структуру.

До цього часу багатьма науковими дослідженнями було доведено існування зв'язку між функціонуванням мікротрубочок та активністю серин/треонін-специфічних протеїнфосфатаз типів PP1, PP2A/PP2B, PP4 (PPX), PP6 і PP7. Вважається, що протеїнфосфатази типу PP1, PP2A і PP4 здатні до прямого дефосфорильовання α - , β - і γ -тубуліну, що підтверджується їх впливом на організацію мікротрубочок *in vitro*. Водночас, у випадку протеїнфосфатаз типів PP6 і PP7, доведена лише їх участь у регуляції мітозу і клітинного циклу, але безпосередня взаємодія з тубуліном залишається під питанням. Особливої уваги заслуговує група, яка об'єднує класичні та дуальні тирозинфосфатази (RTP1B, CDC25, RTPN1, RTPN11, RTPN13, RTP14, DSP-DEP1, DSP7, DSP14B). Показано, що протеїнфосфатази CDC25a і CDC25b здатні активувати циклін-залежні протеїнінази, які в свою чергу контролюють окремі фази мітозу. Протеїнфосфатаза RTP1B сприяє проліферації клітин, а RTPN11 (SHP2) необхідна для підтримки стабільності організації хромосом. Таким чином, незважаючи на асоціацію вищезазначених протеїнфосфатаз з тубуліном, функції кожної з них унікальні і відрізняються значною спеціалізацією.

Вивчення структурних механізмів взаємодії специфічних інгібіторів з протеїнфосфатазами, пов'язаними з регуляцією цитоскелету, є важливим напрямом досліджень. Ефективні та специфічні інгібітори протеїнфосфатаз є важливим інструментом дослідження ролі ферментів у мережі сигнальних каскадів клітини і, водночас, відкривають нові перспективи в галузі розробки інноваційних фармацевтичних препаратів.

Існує широкий спектр інгібіторів протеїнфосфатаз, які відрізняються за рівнем селективності і, відповідно, можуть використовуватися для дослідження різних клітинних процесів. Враховуючи спеціалізовані функції окремих протеїнфосфатаз, а також потенціал їх практичного використання як важливих молекулярних мішеней, існують значні і очевидні прогалини стосовно механізмів регуляції їх активності. Особливо це твердження має пряме відношення до наших уявлень щодо особливостей будови сайтів ліганд-білкової взаємодії і визначення структурних механізмів, що обумовлюють

селективну дію окремих інгібіторів протеїнфосфатаз рослинного походження. Оскільки такі дані практично відсутні, дослідження механізмів взаємодії рослинних протеїнфосфатаз із специфічними інгібіторами є надзвичайно актуальними.

Отже, мета, задачі і методи досліджень, що були поставлені та вирішені здобувачем, є актуальними і підтверджують необхідність і обґрунтованість дисертаційних досліджень Самофалової Д.О.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Робота відповідає планам науково-дослідних робіт ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України» і виконувалась в рамках декількох бюджетних і конкурсних тематик: «Геноміка та клітинна біологія цитоскелету рослин як інструмент для вивчення його структури і функцій та розвитку нових біотехнологій» (2015-19 рр., № ДР 0115U002084); «Вивчення цитоскелету як критичної мішені для розробки нових агробіотехнологій та пошуку біологічно активних речовин за допомогою засобів геноміки та біоінформатики» (2010-14 рр., № ДР 0110U001224); а також в межах спільного проекту НАН України – НТЦУ №5215 «Пошук ефективних інгібіторів протеїнфосфатаз за допомогою нанохімічних підходів і оцінка їх біологічної ефективності *in silico*» (2009-10 рр., № ДР 0110U005523). Всі ресурсоемні дослідження виконано в рамках роботи BO CSLabGrid, що є частиною Українського Національного Грідуну.

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів, ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертаційна робота Самофалової Д.О була виконана на сучасному науковому та методичному рівні і ґрунтується на значному матеріалі оригінальних досліджень. Зокрема, в роботі було вперше реконструйовано повні фосфатоми рослин і проаналізовано еволюційну дивергенцію фосфатомів вищих рослин і людини, а також визначено групу рослинних гомологів тваринних протеїнфосфатаз, що належить до суперродин серин/треонін-, тирозин- та аспартат-специфічних протеїнфосфатаз. Відібрано групу рослинних протеїнфосфатаз, пов'язаних з регуляцією структури та функцій мікротрубочок. Автором встановлено структурні особливості взаємодії інгібіторів з протеїнфосфатазами рослин. Показано, як отримані дані розширюють уявлення стосовно механізмів, що обумовлюють селективність існуючих інгібіторів до протеїнфосфатаз рослинного походження. Наукові положення, висновки і рекомендації, сформульовані в дисертації є повністю обґрунтованими і мають фундаментальне значення.

Практичне значення одержаних результатів. В роботі реконструйовано тривимірні моделі протеїнфосфатаз людини і представників ряду одно- та дводольних рослин. Отримані оригінальні дані щодо їхніх молекулярних сайтів взаємодії з інгібіторами різної хімічної природи є важливими для подальшого раціонального дизайну сполук з підвищеною спорідненістю до зазначених

молекулярних мішеней та дозволяють оптимізувати процес їх розробки. Похідні досліджених сполук з більшим рівнем спорідненості до цільових білків можуть знайти застосування як потенційні інгібітори протеїнофосфатаз рослинного походження.

Слід зазначити, що результати проведених дисертантом досліджень були використані у навчальному процесі для підготовки фахівців за спеціальністю – біологія клітини та біоінженерії у Навчально-науковому центрі «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка при викладанні спецкурсу «Біоінформатика».

Особистий внесок здобувача. Викладені в дисертації результати було отримано автором особисто або за його безпосередньою участю.

Повнота викладу результатів у наукових публікаціях. За матеріалами дисертаційної роботи автором опубліковано 7 статей у фахових виданнях (3 з яких входять до наукометричної бази даних Scopus), а також 15 тез у збірниках закордонних і вітчизняних конференцій.

Структура дисертації. Дисертація автору складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 297 найменувань і додатків. Основний зміст дисертації викладено на 165 сторінках комп'ютерного тексту, проілюстровано 15 таблицями та 47 рисунками і доповнено додатками.

У роботі чітко сформульовано мету і завдання дослідження. Матеріали і методи дослідження відповідають сучасному світовому рівню і цілком відповідають завданням дослідження. Висновки цілком логічні, відповідають поставленій меті і завданням дисертаційного дослідження.

Окремі дискусійні питання і зауваження до дисертації. 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:

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. В огляді літератури, на жаль, не відображений стан розвитку структурної біоінформатики в світі і зокрема в Україні. Варто було б описати комп'ютерне моделювання просторової структури і молекулярної динаміки ряду білків, проведені в Україні, які добре ілюструють переваги методів біології *in silico*.

3. В розділі «Матеріали і методи досліджень» текст перевантажений посиланнями на програми і загальноновживані методи. Наприклад, стор. 58, розділ 2.2.2 – для цитування програми ClustalX достатньо інтернет лінку. Останнє є загальним зауваженням до дисертації.

4. Для моделювання молекулярної динаміки автором було використано стару версію програми Gromacs 4.5. Це найбільш застаріла із версій, що наразі доступні на офіційному сайті Gromacs. Не зовсім зрозуміло використання саме такого програмного забезпечення. Остання версія Gromacs встановлена в аналітичному блоці віртуальній лабораторії MolDynaGrid і доступна для всіх користувачів Українського національного гріду.

5. В дисертаційній роботі зустрічаються невдалі терміни, наприклад: ...сира структура, ... 3-мірні моделі (стор.59).

6. У розділі 3.3-3.4 філогенетичний аналіз протеїнофосфатаз здійснений на підставі двох методів Neighbor-Joining та еволюційного методу (UpGMA), але не зрозуміло, чому описання зведено тільки до одного методу зв'язування найближчих сусідів.

7. Детальний опис докінгу та принципів роботи програми CCDC GOLD (стор. 116-157) в розділі «Результати дослідження», необхідно було привести в розділі «Матеріали і методи», з зазначенням відповідного бібліографічного посилання на «Інструкцію користувача».

8. При описанні механізмів ліганд-білкових взаємодій дисертант робить висновки виключно на основі даних молекулярного докінгу та молекулярної динаміки. При цьому, не аналізується функціональна роль амінокислотних залишків що приймають участь у зв'язуванні інгібіторів протеїнофосфатаз, на основі експериментальних методів.

9. Слід відзначити, що взаємодія лігандів з білком ще не є гарантією того, що хімічна сполука здатна проникнути у клітину. На жаль, в дисертаційній роботі відсутнє теоретичне або експериментальне опрацювання транспорту інгібіторів протеїнофосфатаз у клітину. Проте це може бути напрямком майбутніх досліджень.

Вказані зауваження не применшують результати і значення дисертаційної роботи. Загалом вони носять рекомендаційний і дискусійний характер і не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Висновок: Враховуючи все вищесказане, вважаю, що дисертаційна робота Самофалової Д.О. «Реконструкція просторової структури протеїнофосфатаз, задіяних в регуляції цитоскелету у рослин, та структурно-біологічні механізми їх взаємодії зі специфічними інгібіторами» представляє собою завершену наукову працю, присвячену важливій науковій і практичній проблемі. За структурою, актуальністю задач, теоретичним і методичним

рівнем, новизною, фундаментальним та практичним значенням отриманих результатів дисертаційна робота цілком відповідає вимогам пунктів 9, 10, 12 Кабінету міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р., зі змінами № 656 від 19.08. 2015, № 1159 від 30.12.2015, № 567 від 27.07.2016, а також відповідає вимогам Міністерства освіти і науки України до кандидатських дисертацій, а її автор – **Дарія Олексіївна Самофалова** безумовно заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія.

Офіційний опонент

член-кореспондент НАН України,

доктор біологічних наук, професор,

завідувач відділу білкової інженерії та біоінформатики

Інституту молекулярної біології і

генетики НАН України



О.І. Корнелюк

Підпис *Корнелюк О.І.*
посвідчується
Зав. пачк. В. Мейсера