

## ВІДГУК

**офіційного опонента на дисертаційну роботу П.А. Карпова «Кіном мікротрубочок як невід'ємна складова регуляції тубулінового коду у рослин», представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія / 091-біологія**

Відомо, що молекули тубуліну, з якого побудовані мікротрубочки, характеризуються значною консервативністю послідовностей і просторових структур. При цьому навіть на рівні окремих організмів мікротрубочки здатні демонструвати значну морфологічну і функціональну гетерогенність. В основі такої структурно-функціональної спеціалізації знаходиться складний механізм, який нещодавно отримав назву «тубуліновий код».

Актуальна концепція «тубулінового коду» була запропонована у 2007 році і заснована на хімічному і функціональному різноманітті мікротрубочок, що є наслідком посттрансляційних модифікацій і диференційованої експресії різних ізотипів тубуліну. Одним з найбільш поширених і важливих типів посттрансляційних модифікацій є фосфорилування. Ензиматичне фосфорилування тубуліну обумовлює конформаційні зміни, впливає на властивості молекулярних інтерфейсів, регулює динамічну нестабільність мікротрубочок, регламентує їх взаємодію з асоційованими білками, регулює активний транспорт тощо. Однак, молекулярні механізми цих процесів багато в чому не з'ясовані, і не в останню чергу через значну кількість мало вивчених протеїназ різних класів, функції яких є незамінними і досить специфічними. Особливо це стосується протеїназ і їх функціональної ролі у вищих рослин.

Дисертаційна робота Карпова Павла Андрійовича «Кіном мікротрубочок як невід'ємна складова регуляції тубулінового коду у рослин» присвячена визначенню протеїназ рослинного походження, що безпосередньо причетні до фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну, ідентифікації сайтів фосфорилування цих білків та з'ясуванню наслідків зазначених модифікації для формування тубулінового коду і функціональної гетерогенності рослинних мікротрубочок. Слід зазначити, що у випадку  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну тварин і дріжджів, існування численних сайтів фосфорилування було підтверджено експериментально. Внаслідок консервативності  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну вважається, що більшість функціонально-важливих сайтів фосфорилування молекул тубуліну тварин і рослин також могли зберегти консервативність і подібність функції. Ситуація ускладнюється існуванням у рослин більш складної організації кіномів і певних структурних відмінностей окремих протеїназ, що виникли внаслідок дивергенції царств і незалежної еволюції видів.

З огляду на це обрана тема і актуальність дисертаційного дослідження П.А. Карпова не викликають сумнівів, що також підтверджується публікаціями автора і реалізацією більшої частини виконаних наукових робіт у межах конкурсних програм.

Метою роботи П.А. Карпова було визначення рослинних протеїназ, причетних до безпосереднього фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну, їх сайтів, з'ясування наслідків фосфорилування цих залишків у формуванні тубулінового

коду вищих рослин. У відповідності з метою дисертаційного дослідження в роботі було сформульовано конкретні завдання, що були повністю виконані.

Дисертаційна робота має класичну структуру і складається з вступу, огляду літератури (розділи 1 і 2), інформації про матеріали і методи (розділ 3), експериментальної частини (розділи 4-9), списку літератури (637 джерел) і додатків. Загальний об'єм дисертації складає 545 сторінок. Рукопис містить 21 таблицю і 132 рисунки.

Вступ містить обґрунтування актуальності теми дисертації, відображає зв'язок роботи з науковими програмами, містить: мету, завдання та методи дослідження, розкриває предмет та об'єкт дослідження, формулює наукову новизну одержаних результатів та їх практичне значення, визначає особистий внесок дисертанта та надає дані стосовно апробацію результатів дисертаційного дослідження.

Огляд літератури включає аналіз відомих даних щодо фосфорилування як фактору модуляції тубулінового коду, сайтів фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну у різних видів, а також міжвидової консервативності відомих сайтів зворотного фосфорилування. Важливим є і огляд основних супер-родин і родин протеїнкіназ, для яких доведено факти фосфорилування молекул  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну. При цьому розглядаються представники суперродин AGC і CMGC, близької до CMGC протеїнкінази CK2, родини казеїнкіназ I (CK1) і спільної суперродини CDPK і SnRK (CDPK-SnRK). Огляд літератури підтверджує актуальність теми дослідження, а також забезпечує подальшу інтерпретацію результатів дисертаційного дослідження.

У наступному розділі, присвяченому матеріалам і методам дослідження, розкривається методологічні підходи до біоінформатичного дослідження і описано методика, що застосовувались під час виконання лабораторних досліджень. Автором було використано біоінформатичні методи визначення гомології на рівні послідовностей і структур, білок-білковий і ліганд-білковий докінг, профільний пошук, молекулярну динаміку, методи філогенії і біоінформатичного прогнозування білок-білкових взаємодій. При цьому поряд з біоінформатичним дослідженням було застосовано фізіологічні експерименти, застосовування мутантних і трансгенних рослин, імунологічної мікроскопії, прижиттєвої візуалізації за методом лазерної конфокальної мікроскопії тощо.

Наукові положення, що обговорюються в дисертації, є обґрунтованими. Вони детально викладені у шести розділах. У розділі 4 автором виконано ревізію повного кіному модельної рослини *Arabidopsis thaliana* (1021 протеїнкінази / 1022 каталітичних доменів). Визначено коло протеїнкіназ, що причетні до регуляції мітотичного апарату і регуляції цитоскелету, визначено найбільш перспективні групи агентів тубулінового коду вищих рослин. Наступні розділи 5-8 репрезентують дані стосовно внеску в тубуліновий код протеїнкіназ суперродини AGC і суперродини CMGC і протеїнкінази CK2, родини CK1 і протеїнкінази BRK1 і суперродини CDPK-SnRK. У розділі 9 проаналізовано і узагальнено отримані дані, наведено остаточну інформацію стосовно сайтів фосфорилування  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну вищих рослин і визначено агенти тубулінового коду серед протеїнкіназ. Загалом автором дисертаційної роботи визначено і обґрунтовано 19 протеїнкіназ тубулінового коду вищих рослин і запропоновано узагальнюючу модель внеску фосфорилування в регуляцію

структури і властивостей макромолекулярних комплексів  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну вищих рослин. До того ж застосовані автором обчислювальні і лабораторні методи застосовані коректно і адекватно відповідають задачам дисертаційного дослідження. Отримані дані узагальнюються у 17 висновках, що логічні відповідають результатам виконаних досліджень.

Всі авторські формулювання щодо наукової новизни одержаних результатів є об'єктивними. Перелік вперше отриманих автором результатів стосується різних аспектів роботи, в тому числі і фосфорилювання як фактору тубулінового коду, що забезпечує функціональну гетерогенність і спеціалізацію мікротрубочок, проведення ревізії кіному *Arabidopsis thaliana* (1021 протеїнкіназа), визначення кола протеїнкіназ, що причетні до регуляції цитоскелету, клітинного поділу через фосфорилювання молекул  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну. Новизна роботи сформована також знаннями щодо ролі і можливих механізмів участі в клітинних процесах окремих протеїнкіназ.

Науково-практичне значення дисертаційної роботи П.А Карпова полягає в суттєвому розширенні уявлень щодо ензиматичної регуляції мікротрубочок рослин шляхом безпосереднього фосфорилювання  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну. Отримані дані визначають ферменти і сайти такої модифікації. Це значно розширює перелік молекулярних мішеней і можливості впливу на процеси, безпосередньо пов'язані з функціональним станом мікротрубочок: мітотичну активність та ріст клітин; полярність та форма клітин; активний транспорт везикул, гранул і органел; розходження хромосом у процесах мітозу і мейозу. Це відкриває поле для подальшого дослідження сигнальних каскадів, що зв'язують вплив зовнішніх і внутрішніх факторів з відповіддю системи мікротрубочок. Результати дисертаційного дослідження можуть знайти своє подальше застосування у галузях захисту рослин, біотехнології, генної інженерії, селекції тощо.

Принципових зауважень щодо дисертаційної роботи П.А. Карпова немає. Дисертація добре оформлена, проілюстрована необхідними рисунками і таблицями. Поряд з цим можна зазначити наступне.

1. Поза сумнівом, фосфорилювання у рослин відіграє важливу роль. Про це, зокрема, свідчить те, що в середньому 4% рослинних геномів складають саме гени протеїнкіназ. Перші роботи, присвячені реконструкції кіному *Arabidopsis thaliana* було представлено понад 15 років тому. Очевидно, в роботі варто було б зазначити, в чому кардинальна відмінність представлених даних і чому була потрібна окрема ревізія.

2. Під час дослідження, зокрема у випадку СК1 (розділ 7), автор застосував профілювання АТФ-зв'язувальної кишені з метою визначення пріоритетних мішеней СК1-специфічного інгібітора - D4476. Виникає питання, чи існують приклади реалізації подібних методів і чи можливе застосування цього підходу на рівні повного кіному?

3. Остаточна кількість протеїнкіназ тубулінового коду рослин у викладі дисертаційного матеріалу змінюється від 19 до 20, що варто було б пояснити.

4. Всі наведені автором протеїнкінази тубулінового коду *Arabidopsis thaliana* належать до консервативного пулу древніх протеїнкіназ, про що свідчить рис. 1 автореферату (або 4.1. рукопису дисертації). Чи означає це, що серед так званих «нових протеїнкіназ» немає агентів тубулінового коду?

5. Дисертація добре оформлена, проілюстрована необхідними рисунками і таблицями. Однак іноді текст вміщує не зовсім вдалі граматичні конструкції або незначні помилки.

Однак, ці зауваження не є суттєвими. Вони не мають загального характеру і є швидше рекомендаційними та жодною мірою не впливають на високу позитивну оцінку дисертаційної роботи П.А. Карпова.

За результатами дисертаційної роботи було опубліковано 65 наукових праць, з них 27 статей у фахових виданнях, 2 розділи монографій, виданих закордонними видавництвами, 38 тез доповідей міжнародних та вітчизняних конференцій. Наукові публікації повністю відображають зміст представленої роботи. Наукові положення дисертації і автореферату ідентичні.

На підставі аналізу матеріалів рукопису і автореферату дисертації Карпова Павла Андрійовича вважаю, що виконана робота є оригінальним і завершеним дослідженням. Представлена до захисту дисертація виконана на сучасному методологічному рівні, має наукове та практичне значення, що підтверджується відповідними публікаціями. Робота добре ілюстрована, а зроблені автором висновки виважені, послідовні і логічні.

З огляду на вищевикладене вважаю, що дисертаційна робота Карпова Павла Андрійовича «Кіном мікротрубочок як невід'ємна складова регуляції тубулінового коду у рослин» є самостійним дослідженням, яке 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).

Доктор хімічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України,  
завідувач відділу механізмів  
біоорганічних реакцій  
Інституту біоорганічної хімії та  
нафтохімії ім. В. П. Кухаря  
НАН України

А.І. Вовк

