

ВІДГУК

**офіційного рецензента на дисертаційну роботу
Булгакова Іллі Володимировича**

**«Біоінформатичний аналіз і моделювання комплексу білків, відповідальних
за асоціацію фагосоми з мікротрубочками рослинної клітини»
представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії за
спеціальністю 091 – Біологія**

Актуальність обраної теми. Як відомо, аутофагія відіграє важливу роль у процесах росту та розвитку у тварин і рослин, у реакціях на стрес, процесах старіння та розвитку хвороб. Однак, каскад міжбілкових взаємодій під час утворення аутофагосом у рослин недостатньо вивчений у порівнянні із білками-гомологами у клітинах тварин і дріжджів. Також, недостатньо вивченими лишаються механізми взаємодії аутофагосом з мікротрубочками, вплив посттрансляційних модифікацій тубуліну та ключових білків, що приймають участь в аутофагії, на регуляцію цього процесу. Створення моделі ранніх стадій утворення аутофагосом дасть можливість розробки стратегій відновлення клітин та тканин у стресових умовах. Вивчення процесів ініціації та організації аутофагосом є ключовим у розумінні функціонування клітин у нормальних фізіологічних умовах та під час біотичного чи абіотичного стресу.

З огляду на це, актуальність теми дисертаційної роботи Булгакова Іллі Володимировича «Біоінформатичний аналіз і моделювання комплексу білків, відповідальних за асоціацію фагосоми з мікротрубочками рослинної клітини» не підлягає сумніву.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у рамках бюджетної науково–дослідницької роботи «Біоінформатичні та молекулярно–клітинні дослідження структури та функцій цитоскелету рослин» (номер держреєстрації 0120U100937, 2020–2024 рр.) у відділі геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України».

Ступінь обґрунтованості та достовірності. Структура роботи відповідає поставленій меті та завданням, які вирішувалися шляхом застосування сучасних

методологічних підходів *in silico*. Проведено значний обсяг експериментальної роботи з використанням сучасних методів біоінформатичного аналізу. Висновки та наукові положення логічно сформульовані на основі отриманих результатів і є достатньо обґрунтованими. Під час проведення дослідження автором опрацьовано значний обсяг літератури, що забезпечило міцне теоретичне підґрунтя для інтерпретації отриманих результатів. Порівняння отриманих результатів з даними попередніх досліджень дозволило запропонувати науково обґрунтовані пояснення виявленим закономірностям.

Наукова новизна. Вперше побудовано 3D-моделі комплексів білків родини ATG (Atg1 та ATG3–ATG5–ATG7–ATG16) з білком ATG8, що приймають участь в ініціації аутофагії. Досліджено особливості взаємодії ключового білка ATG8 рослинного походження із мікротрубочками. Визначено сайти ацетилювання ізотипів ATG8 та молекул α -тубуліну, побудовано просторові моделі ізотипів ATG8 *A. thaliana*. Охарактеризовано вплив ацетилювання α - та β -тубуліну, а також білка ATG8, на вторинну структуру цих білків та їх здатність до білок-білкових взаємодій.

Практичне значення. Побудовано просторові моделі різних ізотипів ATG8, продемонстровано механізми спорідненості ATG8 з різними адаптерними пептидами. Побудовано 3D модель фрагменту мікротрубочки *A. thaliana*, що складається з мономерів α - та β -тубулінів. Ці моделі можуть бути використані для дослідження впливу посттрансляційних модифікацій та мутацій на зміни фізіологічних та біохімічних характеристик молекул тубуліну у складі мікротрубочок, для дослідження взаємодії тубулінів із білками, асоційованими з мікротрубочками (MAP), тощо. Отримані дані можуть бути використані для пошуку інгібіторів субстратів ATG8.

Повнота викладу у фахових виданнях та апробація основних результатів. Результати дисертаційної роботи Булгакова Іллі Володимировича у повній мірі висвітлені у 3 статтях, що індексуються у міжнародних наукометричних базах даних (Scopus/Web of Science) та опубліковані у високореєтингових журналах, що належать до **Q1/Q2**, 3 статтях у вітчизняних

фахових виданнях та 2 тезах доповідей на українській та міжнародній наукових конференціях. Основні положення дисертації апробовано на науково–практичних конференціях: IV–й Конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (16–18 травня 2024 р. Київ, Україна), (VII) 7th Congress of the All–Ukrainian Public Organization «Ukrainian Society of Cell Biology» (11–13 вересня 2024 р., Львів, Україна).

Академічна доброчесність. Дисертаційне дослідження виконано з дотриманням принципів академічної доброчесності. Належне оформлення посилань на першоджерела засвідчує наукову етику та відповідальність автора.

Оцінка структури, змісту та форми дисертації. Дисертаційна робота викладена на 187 сторінках машинописного тексту. Структура дисертації представлена анотацією, вступом, 7 розділами, узагальненням результатів та висновками, списком використаних джерел та додатком. Робота містить 27 рисунків та 3 таблиці. Список використаних першоджерел складається з 351 посилань.

Структура та обсяг дисертації, стиль викладу та оформлення, відповідність зазначеній спеціальності. Представлена робота складається з анотації, вступу, огляду літератури (три розділи), опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень (три розділи), висновків, списку використаних джерел і додатку. Обсяг основного тексту дисертації відповідає вимогам та складає 187 стандартних сторінок.

У Вступі містяться всі необхідні структурні елементи дисертації – обґрунтування вибору теми дослідження, мета і завдання, короткий опис методів дослідження, наукової новизни та практичного значення результатів, зв'язок з науковими програмами, особистий внесок здобувача, апробацію результатів у публікаціях та на наукових конференціях.

Розділ 1 літогляду містить вичерпну інформацію про функції аутофагії під час процесів росту та розвитку тваринних, рослинних організмів та дріжджів, у підтриманні гомеостазу та реакціях відповіді на стрес, а також про функції органел та білкових комплексів у процесах аутофагії.

У Розділі 2 основна увага зосереджена на описі механізмів аутофагії у тварин, рослин та дріжджів, на висвітленні молододосліджених етапів цього процесу. Описано основні етапи аутофагії, а також особливості процесів мікро-, макро- та мегааутофагії.

У Розділі 3 розглянуто загальні принципи функціонування мікротрубочок (МТ) та розкрито поняття «динамічної нестабільності МТ». Описано роль оборотних посттрансляційних модифікацій тубулінів у забезпеченні динамічної нестабільності, зокрема, фосфорилювання та ацетилювання. Розкрито роль МТ та їх посттрансляційних модифікацій в процесах ініціації аутофагії, формуванні, транспорту та просторовому розташуванні аутофагосом.

У Розділі 4 описано біоінформатичні підходи, методики, протоколи, інструменти та програмне забезпечення, використані для вирівнювання послідовностей ATG-білків, побудування 3D моделей білків, молекулярної динаміки та молекулярного докінгу. Всі використані методичні підходи дозволили досягти мету та поставлені завдання роботи.

У Розділі 5 детально описано функції білків родини ATG у формуванні аутофагосом, проведено порівняння послідовностей та функцій ортологів білків родини ATG у тварин, рослин та дріжджів. Здійснено 3D-моделювання комплексів білків родини ATG.

У 6 розділі описано результати моделювання фрагменту мікротрубочки рослин та тварин, досліджено вплив ацетилювання окремих залишків лізину у складі мономерів α -тубуліну на стабільність та структуру мікротрубочки, а також на здатність мономерів α -тубуліну формувати зв'язки з сусідніми мономерами та білками, асоційованими з мікротрубочками.

У розділі 7 дисертаційної роботи досліджено взаємодію рослинних ізоформ білка ATG8 із білками-адаптерами та α -тубуліном, а також вплив ацетилювання та ліпидування ATG8 на взаємодію з іншими молекулами (білками-адаптерами, α -тубуліном, ліпідним бішаром аутофагосом).

«Узагальнення результатів дослідження» підсумовує результати, отримані у роботі: можна оцінити вагомий фундаментальний результат дослідження – було

здійснено моделювання багатокомпонентних білкових комплексів білків родини ATG, охарактеризовано їх структуру та характеристики, що дозволяє глибше зрозуміти їх функції в ініціації аутофагії. Крім того, було змодельовано мікротрубочки рослини та людини та з'ясовано роль ацетилювання α -тубуліну на їхню структуру та конформацію. Також було побудовано моделі ізотипів ATG8, продемонстровано механізми зв'язування ATG8 з адаптерними пептидами та досліджено вплив його модифікацій (ацетилювання, ліпидування) на взаємодію з адаптерними білками та ліпідними мембранами.

Висновки до даної роботи чітко сформульовані, зрозумілі та повністю відповідають поставленій меті та завданням.

Дискусійні положення, зауваження та побажання щодо змісту та оформлення дисертації. Під час роботи з дисертацією виникли деякі зауваження та декілька дискусійних питань, що потребують роз'яснення, які не зменшують наукової та практичної цінності роботи:

Зауваження.

1) У «Переліку умовних скорочень» наведена дуже невелика кількість скорочень із тих, що містяться у роботі. Варто було би його доповнити розшифровкою аббревіатур SAR, PAS, AIM, LDS, LIR, ULK, FYWE, FYCO, GABARAP, NBR, AMPK, RAB, mTOR, SNARE, SIR, ATI та інших, що зустрічаються часто у тексті, це полегшило би його сприйняття читачами.

2) Назва Розділу 1 «Фізіологічна роль та механізми аутофагії» некоректно відображає його зміст. Краще було би переформулювати «Характеристика ключових компонентів процесу аутофагії у рослин та тварин», адже механізми аутофагії розкриті у 2 розділі. Аналогічно у підрозділі 1.1 «Органели та клітинні структури, залучені до процесів аутофагії» наведено характеристику комплексу ATG білків, що відіграють ключову роль в аутофагії. Однак, цим білкам присвячені наступні два підрозділи літогляду – варто було би їх характеристику одразу навести у наступних підрозділах.

3) У літогляді бажано було би навести схему або таблицю, що ілюструє відмінність процесу аутофагії у рослин, тварин та дріжджів – це полегшить сприйняття матеріалу.

4) Варто звернути увагу на оформлення рисунків – не всі рисунки коректно оформлені та підписані. Зокрема, на Рис. 5.1 не підписано, послідовності яких організмів порівнюються у таблиці; на Рис. 6.7 наведено деацетильовані та ацетильовані фрагменти МТ людини, але графік молекулярної динаміки наведений для рослинних білків; на Рис. 7.2 літерами Д, Е, Є, Ж, З позначено відповідні білкові комплекси, але немає позначень А, Б, В, Г; на Рис. 7.3 не підписані стовпчики таблиці, тому не зовсім зрозуміло, що за числа наведені у таблиці тощо. Також слід звернути увагу на граматику та стилістику викладення матеріалу – уникнення тавтологій та складних граматичних конструкцій.

5) Висновок 3 до Розділу 6 варто було би перенести до розділу 7 – у ньому міститься інформація про молекулярну динаміку ATG8 з α -тубуліном, що не була описана у цьому розділі.

Питання, що потребують роз'яснення.

1) Як саме розрізняють процес мегааутофагії і апоптозу, адже в обох каскадах приймають участь деякі спільні вторинні месенджери (PI3K, mTOR, Beclin тощо)?

2) Чим відрізняються процеси аутофагії та апоптозу на клітинному та тканинному рівні?

3) Чи відомі механізми перемикання між каскадами аутофагії і апоптозу?

4) Як саме цілеспрямований мутагенез може покращити розуміння механізмів функціонування ATG8?

Загальний висновок рецензента. Дисертаційна робота Булгакова Іллі Володимировича «Біоінформатичний аналіз і моделювання комплексу білків, відповідальних за асоціацію фагосоми з мікротрубочками рослинної клітини» є завершеним дослідженням, що вирізняється новизною, практичною значущістю

та високим науковим рівнем. Робота відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12.01.2022 із змінами, та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», а її автор, Булгаков Ілля Володимирович, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії (PhD) зі спеціальності 091– «Біологія» (галузь знань – 09 «Біологія»).

Рецензент дисертації,
к.б.н, н.с. відділу клітинної біології
та біотехнології
ДУ «Інститут харчової біотехнології
та геноміки НАН України»

Анастасія БУЗІАШВІЛІ