

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, старшого наукового співробітника відділу клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України
Галини Валеріївни ШЕВЧЕНКО

на дисертаційну роботу Іллі Володимировича БУЛГАКОВА «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 теми дисертації та її зв'язок з напрямками науково-дослідних робіт. Відомо, що під час стресу, голодування або як складова процесу розвитку, у еукаріотів ініціюється аутофагія — консервативний механізм рециркуляції, за допомогою якого клітина позбавляється залишків зруйнованих органел, та який, у цілому, регулює її розвиток та старіння. Незважаючи на важливість аутофагії для забезпечення виживаності при абіотичному та біотичному стресі, багато ключових деталей цього процесу у клітинах рослин залишаються недослідженими. Зокрема, доставка такого компоненту як аутофагосома до вакуолі за допомогою тубулінових мікротрубочок цитоскелету. Вищевказане зумовлює актуальність дисертаційної роботи І.В. Булгакова, присвяченої дослідженню одного із основних складових цього етапу аутофагії – активності комплексу білків ATG, зокрема ATG8, який бере участь у формуванні та функціонуванні аутофагосом через взаємодію із тубуліном. Автор приділяє увагу нерозкритим питанням аутофагії у рослин, а саме, дослідженню яким чином посттрансляційні модифікації ATG8, такі як ацетилювання лізинових залишків, впливає на його просторову організацію та функціонування. Вивчення впливу ацетилювання на стабільність та конформаційні зміни білків, задіяних у аутофагії, є важливою та актуальною темою у молекулярній біології та біофізиці.

Актуальність роботи зумовлена також використанням сучасних біоінформатичних методів, що дозволяє досліджувати процеси аутофагії *in silico*, розкриваючи та передбачаючи багато її можливих механізмів у рослин. Це значно розширює науковий пошук, доповнює експериментальні методи і формує нові дослідницькі перспективи.

Дисертаційну роботу виконано у рамках бюджетної науково-дослідницької роботи «Біоінформатичні та молекулярно-клітинні дослідження структури та функцій цитоскелету рослин» (2020–2024 рр.) у відділі геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації. Аналіз дисертації Булгакова І.В. свідчить, що здобувачем виконано доволі ґрунтовний об'єм біоінформатичних досліджень із залученням таких методів як молекулярне моделювання, докінг, та молекулярна динаміка. Це стало основою для моделювання комплексу білків родини ATG та визначення основних ділянок взаємодії між білками ATG та мікротрубочками і мембранними структурами. Дисертантом проведено широкий аналіз комплексу білка ATG1, реконструйовано білок ATG8 рослин та змодельовані ефекти його ацетилювання та ліпидування, перевірена можливість зв'язування ATG8 із сайтами ацетилювання на поверхні молекул тубуліну тощо. Отримана характеристика впливу ацетилювання на поведінку ключових білків (ATG8, α - тубуліну) стала підґрунтям для створення вихідної платформи поглибленого вивчення клітинних механізмів залучення різних ізотипів білка ATG8 у процес аутофагії у рослин.

Достовірність представлених результатів підтверджено таблицями (3), рисунками (27) та обґрунтованими узагальненнями. Аналіз великого масиву власних даних доповнений теоретичною основою, що відображає цитування 351 наукових джерел. Порівняння отриманих результатів з даними попередніх досліджень а також даними щодо процесів аутофагії у тварин та людини дозволило підтвердити певні закономірності, виявити відмінності та запропонувати обґрунтовані пояснення.

Новизна наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації. Вперше за допомогою методів молекулярної динаміки досліджено вплив ацетилювання залишків лізину K49 та K51 білка ATG8 з *Arabidopsis thaliana* на його конформаційну стабільність та здатність до взаємодії з іншими білками. Показано, що модифікація Lys49 призводить до зміни просторової орієнтації АІМ-зв'язувальної ділянки, що потенційно впливає на афінність ATG8 до білків-акцепторів. Встановлено відмінності у поведінці ацетильованих і неацетильованих форм ATG8 у присутності модельної мембрани, що розкриває нові аспекти аутофагічних процесів у рослин. Отримані результати доповнюють уявлення про молекулярні механізми регуляції ATG8 та є основою для подальших експериментальних досліджень впливу посттрансляційних модифікацій на функціонування білків аутофагії.

Повнота викладу основних наукових результатів роботи в опублікованих працях. Дані дисертаційної роботи Булгакова І.В. оприлюднені у публікаціях, які розкривають тематику розділів та вичерпно відображають отримані результати досліджень. Усього за темою дисертаційної роботи у відкритому доступі опубліковано 8 наукових праць, з них 6 статей у фахових виданнях, серед яких 2 статті у журналах рівня квартиля Q1 та 1 стаття у журналі рівня квартиля Q2 а також 2 тез доповідей на вітчизняних конференціях.

Практичне значення отриманих результатів. Результати молекулярно-динамічного моделювання, представлені у роботі Булгакова І.В., дозволяють глибше зрозуміти роль ацетилювання залишків Lys49 та Lys51 у регуляції функціональної активності білка ATG8 у *A. thaliana*. Це може стати основою для розробки біотехнологічних підходів, спрямованих на модифікацію системи аутофагії у рослин з метою підвищення їхньої стійкості до абіотичних і біотичних стресів. Отримані дані можуть бути використані при створенні нових стратегій у рослинній селекції та біоінженерії для покращення адаптивного потенціалу культурних видів, а також у подальших дослідженнях посттрансляційних модифікацій білків аутофагії як перспективних мішеней для регуляції метаболічних процесів.

Структура та обсяг дисертації, стиль викладу та оформлення, відповідність зазначеній спеціальності. Представлена робота складається зі вступу, огляду літератури (3 розділи), опису матеріалів і методів досліджень, результатів (3 розділи), висновків, списку використаних джерел і додатка. Обсяг основного тексту дисертації відповідає вимогам та складає 143 стандартні сторінки. Структура роботи відповідає поставленій меті та завданням, які вирішувалися шляхом застосування сучасних методологічних підходів *in silico*. Викладення матеріалу у тексті дисертаційної роботи структуроване і логічне, дані проілюстровані та статистично обґрунтовані. Дисертаційна робота відповідає спеціальності 091 – «Біологія».

Запитання. При ознайомленні із представленою роботою виникають наступні питання:

1. Чи можна ацетилювання білків розглядати як маркер стресу?
2. Як можна пояснити відсутність значних змін у структурі β -тубуліну при ацетилюванні α -тубуліну і чому вибір саме ацетилювання лізинових залишків є важливим для вивчення структурної динаміки мікротрубочок?
3. Як результати молекулярної динаміки узгоджуються з експериментальними даними про стабільність мікротрубочок?
4. Чи можуть отримані дані щодо регулювання аутофагії бути використані для визначення впливу стресових факторів на цитоскелет?

Зауваження.

У тексті дисертаційної роботи місцями відмічається перенавантаження великою кількістю технічних деталей в одному абзаці без достатнього пояснення, бракує узагальнень, які пов'язують структурні деталі з функціональним значенням, що, загалом, ускладнює розуміння матеріалу. Часто текст у експериментальній частині більше нагадує огляд літератури, тому було б корисно чіткіше виділити власні внески автора.

Підписи під рисунками не завжди вдалі (наприклад - рис. 5.1 — невідомо із якими організмами порівнювали, 5.5., 5.6 — описова інформація, яка має бути

в основному тексті, тощо).

Переважна кількість скорочень, які використовуються у тексті, відсутня у загальному списку.

Загальний висновок і оцінка дисертації щодо її відповідності чинним вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертаційна робота Булгаков І.В. «Біоінформатичний аналіз і моделювання комплексу білків, відповідальних за асоціацію фагосоми з мікротрубочками рослинної клітини» є завершеним науковим дослідженням, виконаним на актуальну тему. Зв'язок об'єктів, предмету, мети, завдань, методів і наукові результати дозволили змодельовати ключові взаємодії білків АТГ у клітинах *A. thaliana* та показати роль посттрансляційних модифікацій у регуляції аутофагії. За своєю актуальністю, новизною, достовірними науковими даними і повнотою представлення результатів у наукових виданнях дисертаційна робота відповідає вимогам до наукової кваліфікації ступеня доктора філософії, що встановлені Постановою КМУ «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12.01.2022 р. № 44 із змінами, та наказу МОН України від 12.01.2017 № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», а Ілля Володимирович Булгаков заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

Доктор біологічних наук,
Старший науковий співробітник
Відділу клітинної біології та анатомії
Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного
НАН України

Г.В. Шевченко