

ВІДГУК

офіційного опонента, кандидата біологічних наук, доцента, завідувача кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики ННІ високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка
Олексія Юрійовича НИПОРКА

на дисертаційну роботу Булгакова Іллі Володимировича **«Біоінформатичний аналіз і моделювання комплексу білків, відповідальних за асоціацію фагосом з мікротрубочками рослинної клітини»**, представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 – Біологія.

Актуальність теми дисертації та її зв'язок з напрямками науково-дослідних робіт.

Важко уявити собі будь-який процес, що відбувається в цитоплазмі еукаріотичної клітини, до перебігу якого в тій чи іншій мірі була б залучена мікротрубочкова частина цитоскелету. Особливо це стосується процесів, складовою частиною яких є везикулярний транспорт. Яскравим прикладом такого процесу є аутофагія, а саме утворення аутофагосом, їх подальший транспорт вздовж мікротрубочки та злиття з лізосомами. Варто зазначити, що фізіологічна роль аутофагії є надзвичайно важливою, оскільки цей процес забезпечує підтримання клітинного гомеостазу, утилізацію пошкоджених органел та білків, а у випадку стресу в залежності від ступеня пошкодження клітини аутофагія може сприяти або загибелі, або виживанню клітини.

Незважаючи на багаторічний стійкий інтерес світової наукової спільноти як до цитоскелету, так і до аутофагії, роботи, що розглядають взаємодію мікротрубочок з аутофагосомами, досить нечисленні. Наразі відомо, що у випадку рослинної клітини ця взаємодія опосередкована білком Atg8, який не лише забезпечує розпізнавання субстрату, що підлягає утилізації, але взаємодіє з мультибілковим комплексом Atg1, який є необхідним для ініціації формування аутофагосом. Відповідно, можна висказати дещо сміливе припущення, що мікротрубочка не лише транспортує фагосому та забезпечує

її «зустріч» з лізосою, але може бути своєрідною платформою для формування зазначеного ініціаторного комплексу і відповідно, коректного утворення аутофагосоми як такої. Для спростування або підтвердження цієї гіпотези необхідно мати чітку детальну інформацію щодо просторової організації відповідного комплексу та (мікро)структурні механізми його взаємодії з компонентами мікротрубочки, в першу чергу – з альфа- та бета-тубуліном. Саме тому актуальність дисертаційного дослідження Булгакова Іллі Володимировича, присвяченого біоінформатичному аналізу і моделюванню комплексу білків, відповідальних за асоціацію фагосоми з мікротрубочками рослинної клітини, не підлягає жодному сумніву.

Дисертаційне дослідження виконане у відділі геноміки та молекулярної біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» в рамках бюджетної теми «Біоінформатичні та молекулярно-клітинні дослідження структури та функцій цитоскелету рослин» (№ держреєстрації 0120U100937, 2020–2024 рр.).

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.

Автором проведено колосальну роботу по узагальненню існуючої інформації, яка стосується предмету дисертаційного дослідження, що підтверджується як кількістю процитованих джерел – 351, так і активним і доречним їх використанням при аналізі і обговоренні власних досліджень. Власний доробок автора надзвичайно об’ємний і може бути предметом не одного дисертаційного дослідження – реконструкцію повнорозмірної просторової структури окремих ATG-білків та їх комплексів в тваринній і рослинній клітині, дослідження структурних особливостей тубулінів, ацетильованих по різних залишках, дослідження впливу ацетилювання тубулінів на взаємодію з ATG8, дослідження впливу пострасляційних модифікацій (ацетилювання, ліпидувння) на структуру і поведінку компонентів аутофагосоми, дослідження стабільності різноманітних комплексів у часі виконані з використанням широкого методів спектру актуальних методів

біоінформатики, починаючи з вирівнювання білкових послідовностей – через реконструкцію просторової структури взаємодіючих компонентів з використанням сучасних підходів, в тому числі штучного інтелекту (AlphaFold2/Boltz-1x) та білок-білковий докінг – до молекулярної динаміки отриманих комплексів та наступного інтелектуального аналізу отриманих результатів (кластерний аналіз, метод головних компонент).

Викладені міркування є основою для твердження, що положення і висновки, винесені на захист, є обґрунтованими і достовірними. Основні положення і результати проведених досліджень сформульовані у 11 висновках, що логічно витікають з отриманих здобувачем експериментальних даних. Особливою родзинкою роботи є розділ «Узагальнення результатів дослідження», який дає цілісне уявлення про суть виконаної автором наукової роботи.

Новизна наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.

Всі наукові положення, винесені на захист, є новими та оригінальними. Серед них як найбільш цікаві/вагомі варто зазначити такі досягнення:

- вперше проведено комплексний біоінформатичний аналіз рослинних ATG-білків, що формують комплекси Atg1 та ATG3–ATG5–ATG7–ATG16, з моделюванням їхньої взаємодії з ATG8;
- встановлено можливість утворення в клітинах рослин мультимолекулярних комплексів, аналогічних тваринним;
- продемонстровано вплив посттрансляційних модифікацій альфа-тубуліну (ацетилювання K40, K60, K112 тощо) на стабільність мікротрубочок і їх взаємодію з ATG8, що є принципово новим аспектом у вивченні регуляції аутофагії як такої;
- побудовано структурні моделі ліпидування ATG8, що продемонстрували його відмінності від людського LC3 у розташуванні на мембрані.

Отримані результати суттєво розширюють наші уявлення про мікроструктурні механізми, які можуть лежати в основі тонкої регуляції перебігу аутофагії в еукаріотичній клітині.

Практичне значення отриманих результатів.

Моделі просторової структури ATG білків та їх комплексів, розроблені здобувачем, можуть бути використані як основа для раціонального дизайну/пошуку селективних регуляторів взаємодії ATG8 з природними біомолекулярними партнерами. Це, в свою чергу, відкриває перспективи керування перебігом аутофагії, що має практичне значення як у сільськогосподарській біотехнології (підвищення стійкості рослин до біотичних і абіотичних стресів, формування імунітету проти патогенів), так і у медицині (розробка протипухлинних чи нейропротекторних засобів). Крім того, отримані результати мають навчально-методичну цінність: вони можуть бути використані у викладанні курсів із біоінформатики, молекулярної та клітинної біології, біотехнології для практичного ознайомлення студентів із сучасними підходами до структурного моделювання, білок-білкових взаємодій і молекулярної динаміки.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях.

Результати досліджень, представлені в дисертації, повністю викладені в опублікованих роботах. За темою дисертації опубліковано 6 статей у фахових виданнях, у тому числі 2 статті у журналах, що індексуються у Scopus та Web of Science (*Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* (Q1), *Cell Biology International* (Q2)). Також результати представлені у 2 тезах доповідей міжнародних конференцій.

Академічна доброчесність.

Дисертація та наукові публікації, у яких висвітлені основні наукові результати дисертації, не містять ознак академічного плагіату.

Зауваження щодо змісту та оформлення дисертації.

Представлена до захисту дисертаційна робота є оригінальним науковим дослідженням, що суттєво розширює наші уявлення про механізми регуляції

перебігу аутофагії у рослин. Однак в плані побажань для подальшої наукової роботи слід зробити деякі зауваження:

1. Об'єкта дослідження в роботі сформульовано як біоінформатичні та молекулярно–клітинні дослідження структури та функцій цитоскелету рослин. Таке визначення є некоректним – дослідження як такі не є об'єктом дослідження.
2. В розділах 1-3 дисертації, які по суті є оглядом літератури, немає жодної ілюстрації. Принаймні, схеми, які ілюструють сучасні уявлення про структуру аутофагосом та процеси ініціації аутофагії, були б дуже доречними і полегшували сприйняття наведеної інформації.
3. В підрозділі 6.1 «Матеріали» варто було навести назви і коди доступу UniProt всіх послідовностей білків, які було опрацьовано в ході дисертаційної роботи. Ця інформація дозволила б одразу отримати структуроване уявлення про обсяг та логіку проведеного дослідження.
4. Розділ 5 написаний таким чином, що в ньому результати власних досліджень здобувача важко відокремити від числених літературних даних, наведених в ньому. Автору бажано б спочатку представити в цьому розділі свої результати, а вже потім обговорювати їх, залучаючи дані інших дослідників.
5. Незрозуміло, на що вказує напис «Кіназний домен» на рисунку 5.2.
6. В підписі до рисунка 5.4 зазначено «ATG13 (жовтий), ATG101 (жовтий)», тоді як на самому рисунку один з цих білків пофарбовано в блакитний колір.
7. На стор. 74 автор пише «...рівень флуктуацій зменшується і коливається в межах...». Флуктуації є випадковими змінами величини параметра, відповідно, до них не можна застосовувати поняття коливань. В даному випадку мова йде про діапазон зміни параметра (середньоквадратичного відхилення).

8. Автор досить вільно поводить з науковою термінологією. На стор. 85 можна, зокрема, знайти вирази «рівень гомології» та «ступінь гомології». Гомологія – спільність походження – не є кількісною характеристикою (вона або є, або нема). Також вираз «висока гомологія» можна знайти на стор. 136.
 9. Автор в ряді випадків використовує термін «механістичний», зокрема «механістичне розуміння» (стор. 27), «механістична модель» (стор. 90), «механістичні передумови» (стор. 132). Незрозуміло, що має на увазі автор під цим терміном.
 10. На стор. 119 згадується «існування синглетного домінуючого кластера». Термін «синглетний» не має жодного стосунку до молекулярної механіки.
 11. В роботі зустрічаються помилки технічного характеру. На рис. 6.2 (стор. 96) індикаторні літери закривають частину структурної інформації. На стор. 139 «було змодельовано тривимірні моделі».
- Ці зауваження є рекомендаційними і ніяким чином не зменшують загальної наукової цінності виконаної роботи.

Загальний висновок.

Дисертаційна робота Булгакова Іллі Володимировича «Біоінформатичний аналіз і моделювання комплексу білків, відповідальних за асоціацію фагосоми з мікротрубочками рослинної клітини» є цілісним завершеним науковим дослідженням, що за своєю актуальністю, методичним рівнем, глибиною розкриття поставлених проблем, науковою новизною та практичною цінністю отриманих результатів, логічністю та обґрунтованістю висновків 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 її автор Ілля Володимирович Булгаков заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

Завідувач кафедри
молекулярної біотехнології та біоінформатики
ННІ високих технологій
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
кандидат біологічних наук, доцент

Олексій НИПОРКО