

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Пидюри Миколи Олександровича «Аналіз структурної організації родини генів тубулінів і целюлозосинтаз льону та взаємозв'язку їх експресії у ході формування целюлозного волокна», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Актуальність проблеми. Збереження в процесі еволюції генів-паралогів та їх диференційована експресія в залежності конкретної тканини та стадії розвитку організму є вагомими аргументами на користь того, що білкові продукти цих генів набувають певної спеціалізації, експлуатуючи, зокрема, локальні зміни своєї афінності до високомолекулярних та/або низькомолекулярних партнерів. Проте у багатьох випадках характер цієї спеціалізації залишається нез'ясованим попри числені дослідження відповідних генних/білкових родин. Продуктивним у цьому плані можуть бути роботи, спрямовані на дослідження таких клітинних процесів, які вимагають координованої роботи білків, що є продуктами генів-паралогів різних родин. Прикладом такого процесу є синтез целюлозних мікрофібрил у вищих рослин, який забезпечується координованою роботою актинових філаментів, мікротрубочок і власне целюлозосинтезуючих комплексів. Можна припустити, що саме ізотипний спектр білків – компонентів цих комплексів (актинів, тубулінів та целюлозосинтаз відповідно) – визначатиме індивідуальні особливості організації клітинної стінки у різних популяцій в межах виду. Розуміння принципів і структурних механізмів взаємодії зазначених компонентів між собою представляється особливо цінним з огляду на можливості їх ефективного використання в сільському господарстві, зокрема, для отримання культур льону із заданими властивостями волокна, із використанням, за необхідністю, технологій редагування відповідних генів. Цілком зрозуміло, що передумовою цього має бути наявність вичерпної інформації про спектр відповідних генів-паралогів досліджуваного виду рослин та взаємозв'язку їх експресії, якщо такі є. З огляду на ці міркування, актуальність роботи Миколи Олександровича Пидюри, яка присвячена пошуку та аналізу

структурної організації родини генів тубулінів і целюлозосинтаз льону та взаємозв'язку їх експресії у ході формування целюлозного волокна, не підлягає жодному сумніву.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.
Дисертаційна робота виконувалась в рамках бюджетних НДР відділу геноміки та молекулярної біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» «Використання Грід для високопропускового скринінгу біологічно активних речовин з підвищеною спорідненістю до тубулінів як базової складової реалізації програмних засад віртуальної організації CSLabGrid» (№ ДР 0113U004047, 2011–2013рр.); «Вивчення цитоскелету як критичної мішені для розробки нових агробіотехнологій та пошуку біологічно активних речовин за допомогою засобів геноміки та біоінформатики» (№ ДР 0110U001224, 2010–2014 рр.); «Геноміка та клітинна біологія цитоскелету рослин як інструмент для вивчення його структури і функцій та розвитку нових біотехнологій» (№ ДР 0115U002084, 2015–2019 рр.); «Створення молекулярно-генетичних маркерів для диференціації різних генотипів рослин на основі вивчення поліморфізму інтронів генів їх цитоскелетних білків» (№ ДР 0115U005025, 2017–2019 рр.).

Основні результати, отримані дисертантом, їх наукова новизна та практичне значення.

Результати, отримані здобувачем в ході виконання роботи, крім власне наукової цінності та новизни, несуть, також, і виражене прикладне значення. Генетичні модифікації з метою покращення якості целюлозного волокна засновані на модифікації ендогенних генів, спрямовані на певні сайти вже наявних генів, без введення чужорідних генів, можуть бути значно краще сприйняті тими країнами, які негативно ставляться до трансгенних культур, а це, в свою чергу, може відкрити нові перспективи не лише для поліпшення агрономічних ознак у культурних рослин, а для успішної комерціалізації в відповідних сортів льону.

Шляхом аналізу неанотованих геномних даних Миколою Олександровичем вперше ідентифіковано гени α -, β - і γ -тубулінів, актинів і целюлозосинтаз льону та визначено відповідні білки-паралоги. Окрім того, автор проаналізував варіабельність послідовностей зазначених генів та зробив висновок про

індивідуальні структурні особливості, які характерні для послідовностей тубулінів льону.

Шляхом аналізу екзон-інтронної архітектури виявлених генів автором вперше показано, що поліморфізм довжини інтронів генів тубуліну і актину *Linum* свідчить про те, що пов'язані з інтронами регуляторні елементи можуть впливати на експресію цих генів, а варіації довжини інтрону 3 α -тубуліну, інтронів 1 і 2 β -тубулінів та інтрону 2 актину позиціонують їх як важливі мішені для дослідження поліморфізму довжини інтронів різних видів *Linum*.

Окремої уваги заслуговує те, що під час виконання роботи було оптимізовано методики комп'ютерних біоінформатичних досліджень та менеджменту даних для можливості повторного використання, на основі чого було опубліковано низку статей. Цей факт свідчить про глибоке розуміння автором методології проведених досліджень та специфіки роботи з біологічними форматами даних.

Також, вперше досліджено експресію різних ізотипів генів, що кодують α - і β -тубуліни, актини і целюлозосинтази льону у динаміці – на різних стадіях швидкого росту у сортів льону різних підвидів. Було оцінено у якій мірі рівні експресії різних транскриптів генів *CesA* залежать від функціонального підкласу продукованого білка, стадії розвитку рослини та конкретного підвиду льону.

Отримані дані можуть бути використані як в подальших дослідженнях, як для вивчення механізмів відкладання клітинної стінки, так і для розробки нових генетичних модифікацій. Зокрема, на основі отриманих у роботі результатів запропоновано стратегії застосування різноманітних сучасних методів редагування генів цитоскелетних білків з метою посилення їх функціональних якостей для покращення целюлозних волокон льону.

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

При виконанні роботи автором застосовано комплексний підхід, що полягає в органічному поєднанні сучасних методів біоінформатики для виявлення в геномі льону генів тубулінів, актинів і целюлозосинтаз та встановлення їх

родинних зв'язків з методами молекулярної біології, які були використані для визначення рівнів експресії досліджуваних генів.

У ході роботи автор ретельно підійшов до пошуку генів у неанотованих даних геному. Зокрема, було досліджено всі неточності, які виникли при автоматичному віднесенні фрагментів. Білкові продукти потенційних генів тубулінів, актинів та целюлозосинтаз додатково перевірялись на приналежність до відповідних родин за допомогою алгоритму, заснованому на прихованій моделі Маркова. Так само ретельно біло проведено і порівняння послідовностей генів у паралогічних парах, визначених в подальшому.

Філогенетичний аналіз було здійснено за допомогою декількох альтернативних підходів, що відповідним чином підвищує надійність отриманих автором результатів. Особливої уваги заслуговує відбір послідовностей близьких видів для побудови філогенетичної картини та віднесення генів до певних ізотипів у випадку генів целюлозосинтаз.

Про високу якість отриманих Миколою Олександровичем результатів свідчать рівень наукових журналів, де вони були оприлюднені. Зокрема, це журнали *Functional and Integrative Genomics* та *Cell Biology International*, що належать до Q1/Q2 та Q2/Q3 відповідно.

Викладені спостереження дають підґрунтя стверджувати, що положення і висновки, винесені на захист, є аргументованими і достовірними. Основні положення і результати проведених досліджень сформульовані у 10 висновках, які логічно витікають з отриманих здобувачем експериментальних даних.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях.

Результати досліджень, представлені в дисертаційній роботі, повністю викладені в опублікованих роботах. За результатами дисертації опубліковано 11 статей в українських та зарубіжних наукових фахових виданнях, зокрема, 5 – у виданнях, що індексуються в Скопус, та 7 тез доповідей у збірниках матеріалів всеукраїнських та міжнародних наукових конференцій.

Зауваження щодо змісту та оформлення дисертації.

Представлена до захисту дисертаційна робота є оригінальним науковим дослідженням, що може суттєво розширити наші уявлення про взаємодію родин

генів тубулінів і целюлозосинтаз під час синтезу волокон целюлози. Однак в плані побажань для подальшої наукової роботи слід зробити деякі зауваження:

Стор. 2 і далі по тексту автор одночасно використовує терміни «родина» і «сімейство». Бажано використовувати термін «родина» як такий, що більше відповідає науковому стилю викладення матеріалу.

Стор. 27. Автору треба було вказати, структурні моделі яких саме рослинних тубулінів було побудовано їм вперше.

Стор. 43. В огляді літератури автор посилається на власні публікації, результати яких виносяться на захист. Посилання на них в цьому розділі, на відміну від розділів, в яких описуються результати досліджень, є недоречним.

Стор. 50 «Первинні послідовності». Послідовності не можуть бути ані первинними, ані вторинними, ані четвертинними. Коректними термінами є «Послідовність» або «Первинна структура». Визначення доменів і мотивів є неправильним. Також сучасні методи визначення просторової структури макромолекул не обмежуються рентгенівською кристалографією та ЯМР-спектроскопією. Варто було згадати хоча б криоелектронну мікроскопію.

Стор. 58. Розділ, присвячений опису системи менеджменту біологічних даних COMODORE, варто було б перенести до опису результатів, оскільки він є розробкою автора.

Стор. 78 містить дивний напис «Зображення з • [Тези]2011 Біоінформаційне дослідження білків, асоційованих з мікротрубочками вищих рослин та аналіз їх подібності – ppt презентація»

Стор. 84. Стосовно білкових продуктів генів термін «пептиди» не вживається.

Стор. 94. Результати підрозділів 3.5 та 3.6 взагалі не представленні у висновках.

Стор. 94. E – не допоміжний ланцюг, а статмін-подібний домен.

Стор. 94. Як шаблони для моделювання просторової структури тубулінів рослин автором використані структури тубулінів тварин лише, у так званій, вигнутій конформації. Бажано було б зробити це для і для випрямленої конформації, яка є основною.

Стор. 94 і далі. Автором отримано цілий ряд моделей просторової структури тубулінів різноманітних рослин, проте серед них немає жодного з тубулінів льону, які власне є об'єктами дослідження в даній роботі і послідовності яких визначено автором. Логічно буде зробити ці моделі при подальших дослідженнях.

Стор. 97, 98. На підписах до рисунків 3.7 та 3.8 не розшифровані кольори літер, що позначають амінокислоти. Незрозуміло, що означають ці кольори.

Стор. 101 Треба дати розшифровку підпису таблиці українською мовою.

Стор. 101. Назва розділу 3.6 не відповідає його змісту, оскільки там взагалі не йдеться про цитоскелетні білки льону.

Стор. 102. Не існує дуже чи не дуже гомологічних тубулінів. Гомологія – суто якісне поняття, що означає спільне походження біологічних послідовностей (генів та їх продуктів). Мабуть, мала на увазі схожість послідовностей.

Також всі рисунки розділу 3.6 надзвичайно малого розміру і практично нечитабельні. Мабуть, автор таким чином вирішив зменшити обсяг тексту дисертації.

Робота б тільки виграла, якщо в ній були б визначені рівні експресії індивідуальних ізотипів тубулінів, як це було зроблено для целюлозосинтаз.

В тексті роботи дисертант використовує посилання на прізвища авторів статей, що передбачає їх алфавітний порядок в списку літератури. Проте список сформований в порядку згадування по тексту, що вельми утруднює його використання.

Крім того, по тексту автором вживаються неологізми неясного змісту, наприклад «біомолекулярна сутність», «функціональний ізотип».

Водночас слід зазначити, що наведені зауваження ні в якій мірі не знижують наукової цінності дисертації. Робота Миколи Олександровича написана гарною літературною мовою і легко читається. Основний зміст автореферату відповідає основним положенням дисертації.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій.

Дисертаційна робота Пидюри Миколи Олександровича, «Аналіз структурної організації родини генів тубулінів і целюлозосинтаз льону та

взаємозв'язку їх експресії у ході формування целюлозного волокна», є цілісною, завершеною науковою працею. За своєю актуальністю, рівнем методичних досліджень, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів, глибиною розкриття поставлених проблем, логічністю і аргументованістю висновків дисертація повністю відповідає вимогам п.п. 9, 11 «Порядку присудження наукових ступенів», що висуваються до дисертаційних робіт, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 №567, а її автор Підюра Микола Олександрович заслуговує на присудження йому вченого ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

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



О. Ю. Нипорко