

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Краснопьорової Олени Євгенівни « Серин-треонінові протеїнкінази підродини SnRK1 (KIN10 та KIN11) *Arabidopsis thaliana*: особливості функціонування та участь в поділі клітин»**, подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика

Актуальність роботи. Більшість біохімічних процесів у рослинній клітині регулюються шляхом фосфорилування/дефосфорилування. Цю функцію здійснюють протеїнкінази. У рослинних клітинах існує велика кількість різноманітних протеїнкіназ, які регулюють такі життєво важливі процеси як ріст, поділ та диференціація клітин, клітинна загибель тощо. Важливими факторами регуляції транскрипційної активності є протеїнкінази підродини SnRK1. Ці ферменти впливають на роботу більше 1000 генів. Крім того вони залучені у реакції адаптації рослин до різних факторів абіотичного стресу. У тваринних організмів функціонування протеїнкіназ добре досліджено. В рослинах механізми сигнальних каскадів набагато складніші, ніж у тварин. Не зважаючи на це, у рослин досліджено велику кількість гомологів тваринних протеїнкіназ, які беруть участь в регуляції цитоскелету, зокрема структури мікротрубочок. Проте, незважаючи на чисельні дослідження, що ведуться у цьому напрямку це питання залишається недостатньо вивченим. Нез'ясованим залишається питання участі протеїнкіназ SnRK1 в процесах клітинного поділу.

Представлена дисертаційна робота Краснопьорової Олени Євгенівни присвячена вивченню особливості функціонування протеїнкіназ SnRK1 KIN10 та KIN11, експресії їх генів за нормальних та стресових умов, а також при поділі клітин *A. thaliana*. Отримані дані є важливими для розуміння сигнальних каскадів та механізмів формування адаптації рослин до умов енергетичного, осмотичного та сольового стресів. Робота має важливе значення для розуміння впливу енергетичного, осмотичного та сольового стресів на корінь рослин. З огляду на все вищесказане роботу Краснопьорової О.Є. слід вважати актуальною.

Структура роботи та обсяг. Дисертація викладена на 159 сторінках тексту, містить 1 таблицю, 23 рисунки і 1 додаток. Робота побудована за традиційною схемою та складається з наступних розділів: вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, результати досліджень, їх аналіз та обговорення, висновки та список використаних літературних джерел, який включає 269 посилань.

Вступ містить необхідну інформацію про актуальність теми, зв'язок роботи з науковими програмами, мету, завдання та методи дослідження. Наведено предмет та об'єкт дослідження, сформульовано наукову новизну одержаних результатів та їх практичне значення, особистий внесок дисертанта та наведено дані про апробацію результатів дисертації.

Розділ «**Огляд літератури**» складається з трьох підрозділів, містить аналіз літературних джерел. Розглядаються сучасні роботи присвячені загальній характеристиці, особливостям функціонування рослинних серинтреонінових протеїніназ. Описано структуру та особливості протеїніназ підродини SnRK1 (KIN10, KIN11), їхні відмінності від протеїніназ підродин SnRK2 та SnRK3. Охарактеризовано відомі гомологи протеїніназ підродини SnRK1, а саме протеїнінази SNF1 дріжджів та протеїнінази. Розглянуто роль протеїніназ у регуляції структури та функцій рослинного цитоскелету. Представлений аналіз наукової періодики доводить актуальність обраної теми та дозволяє обґрунтувати поставлені у роботі дослідницькі завдання.

У розділі «**Матеріали і методи дослідження**» характеризується рослинний матеріал, використаний у дослідженнях. Описано створення конструкцій з химерними генами *KIN10-RFP* та *KIN10-BFP* та трансформація протопластів *A. thaliana* та суспензійної культури BY-2. Детально описано проведення імунофлуоресцентного аналізу, молекулярно-генетичного аналізу експресії генів, біоінформатичного аналізу.

Результати досліджень та їх обговорення представлені у восьми підрозділах. За допомогою біоінформатичних підходів встановлено високу подібність каталітичних доменів протеїнінази BRSK1 людини та протеїніназ SnRK1 (KIN10 і KIN11) з *A. thaliana*. Показано зниження росту

коренів трансгенних ліній *A. thaliana* з гіперекспресією та РНК-інтерференцією гена *KIN10* за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту. За допомогою методів *in silico* доведено можливість фосфорилування цієї протеїнкіназою залишка Сер-131 в молекулі γ -тубуліну *A. thaliana*. Виявлено зниження показників мітотичного індексу та зниження рівня флуоресценції γ -тубуліну у коренях нокаutowаних мутантів *kin10* та *kin11* *A. thaliana* за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту

Останній розділ дисертації – «**Висновки**» – містить 8 висновків, які цілком логічно випливають з проведених досліджень.

Список використаних літературних джерел містить достатню кількість посилань, більше половини з яких оприлюднена за останні 10 років.

Обґрунтованість і достовірність наукових результатів і висновків. Застосовані у роботі теоретичні підходи та лабораторні методи адекватні поставленим задачам. Зроблені у дисертації висновки логічно витікають із отриманих автором даних.

Науково-практична значимість роботи. У дисертації вперше за допомогою біоінформатичних підходів показано високу подібність каталітичних доменів протеїнкінази BRSK1 людини та протеїнкіназ SnRK1 (*KIN10* і *KIN11*) з *A. thaliana*. Вперше показано зниження росту коренів трансгенних ліній *A. thaliana* з гіперекспресією та РНК-інтерференцією гена *KIN10* за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту. Вперше зафіксовано зниження показників мітотичного індексу та зниження рівня флуоресценції γ -тубуліну у коренях нокаutowаних мутантів *kin10* та *kin11* *A. thaliana* за нормальних умов та за умов енергетичного дефіциту. Дані наведених досліджень можуть бути використані як підґрунтя для подальшої розробки практичних підходів вирощування рослин в умовах дії абіотичних стресів.

Повнота викладення основних результатів досліджень у наукових фахових виданнях. За темою дисертації опубліковано 14 наукових праць, з них 8 статей та 6 тез доповідей у профільних виданнях та збірниках матеріалів конференцій.

Автореферат достатньо повно відображає одержані експериментальні результати і основний зміст роботи.

Зауваження щодо змісту та оформлення дисертації.

Робота містить і деякі недоліки та упущення.

1. У розділі «Матеріали та методи досліджень» написано «Для аналізу органоспецифічної експресії *KIN10* використовували двомісячні рослини *A. thaliana*». Які умови вирощування саме цих рослин? Як вирощували рослини для отримання протопластів?

2. У цьому ж розділі: «Після проведення ПЛР ампліфіковані фрагменти генів *KIN10* та *EF α* розділяли за допомогою електрофорезу в 1%-му агарозному гелі. Рівень експресії в різних органах визначали шляхом денситометричного аналізу електрофореграм з використанням програми TotalLab (Велика Британія)». Дані, представлені на рис. 3.9 розділу «Результати та їх обговорення». Проте з рис. не очевидна та різниця у рівнях експресії генів, про яку пише дисертантка. Визначати рівень експресії денситометричним методом є некоректно, оскільки він є застарілим і неточним. Тим більше такий підхід викликає здивування, оскільки для генів *AtCYCB1;1* і *AtBRCA1* та *KIN10* і *KIN11* написано «Для аналізу органоспецифічної експресії *KIN10* використовували двомісячні рослини *A. thaliana* експресію визначали за допомогою кількісної ПЛР».

3. Чому в одних випадках як референтний ген використовували рівень експресії фактору елонгації α (*AtEF α*) в інших ген актину (*AtActin*)? Також не зрозуміло, який представник мультигенною родини актинів був обраний.

4. Не зазначено, як вирощували суспензійну культуру ВУ2. Крім того цю культуру використовували лише в одному експерименті по трансформації протопластів. Не зовсім зрозуміло чим мотивовано вибір цієї культури лише і саме для цього експерименту.

5. Як проводився скринінг/перевірка насіння мутантних ліній отриманих із колекції з Європейського стокового центру арабідопсиса?

6. Для скількох рослин трансгенних ліній *A. thaliana* проводились аналіз росту та розвитку головних коренів та для скількох проростків визначався мітотичний індекс?

7. У розділі «Результати та їх обговорення» на рис. 3.10, 3.11 та ін. на діаграмах стовпчики позначені зірочкою. У підписах вказується, що * означає $p \leq 0,05$. На рисунках такого ж типу 3.12, 3.14 та ін. стовпчики діаграми позначено буквами а, б, с. У підписах не вказується що означають букви. Варто було би на однотипних рисунках робити однакові позначки.

В цілому наведені недоліки не є принциповими і не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Висновок по дисертації. Враховуючи наведене вище, вважаю, що дисертаційна робота «Серин-треонінові протеїнази підродини SnRK1 (KIN10 та KIN11) *Arabidopsis thaliana*: особливості функціонування та участь в поділі клітин», є самостійним завершеним дослідженням, яке за актуальністю теми, обсягом отриманого експериментального матеріалу, особистим вкладом дисертантки, практичному значенню отриманих результатів та обґрунтованістю висновків повністю відповідає вимогам пункту 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого Постановою кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її авторка Краснопорова Олена Євгенівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Професор кафедри молекулярної генетики та біотехнології
Чернівецького національного університету
ім. Юрія Федьковича, доктор біол. наук, проф.

 І.І. Панчук

