

## Відзив

офіційного опонента на дисертаційну роботу Бояршина Костянтина Сергійовича “Структурно-функціональні основи редагуючої активності проліл-тРНК синтетази з *Enterococcus faecalis*”, подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

З'ясування молекулярних механізмів забезпечення однозначної відповідності амінокислотних залишків утвореного поліпептидного ланцюга кодонам мРНК являє собою вкрай важливу наукову задачу, чиє вирішення дає змогу наблизитись до розуміння як регуляції біосинтезу білка в цілому, так і ролі в забезпеченні цього процесу аміноацил-тРНК синтетаз, зокрема – механізмів забезпечення їх надспецифічності. Як відомо, багатьом амінокислотам притаманна висока ступінь структурної подібності бічних ланцюгів, що призводить до високої ймовірності їх помилкового зв'язування аміноацил-тРНК синтетазами з подальшим включенням в утворений поліпептидний ланцюг. При цьому варто підкреслити, що помилкове включення в поліпептидний ланцюг будь-якого структурного аналога такої своєрідної амінокислоти, як пролін, не може не позначитись на структурі та функціональних властивостях утвореної білкової молекули. Однак біосинтез білка відбувається належним чином, що змушує згадати системи, дивні не тим, що працюють бездоганно, а тим, що працюють взагалі. Незважаючи на високу актуальність таких досліджень, механізми виправлення помилкового впізнавання амінокислот аміноацил-тРНК синтетазами лишаються маловивченими. Зумовлено це різноманіттям задіяних в цих процесах молекулярних компонентів, їх складною будовою та неоднозначною дією, різноманітністю виконання редагуючих функцій різними видами аміноацил-тРНК синтетаз і, головне, високими вимогами як до оволодіння значним за об'ємом сучасним науковим матеріалом, так і виключно високим методичним рівнем проведення відповідного

дослідження. Тож тема розглянутої дисертаційної роботи та її мета – охарактеризувати механізми редагування ПроРС бактерії *Enterococcus faecalis* аланіл-тРНК<sup>Pro</sup> – видаються актуальними та заперечень не викликають.

Відповідно до мети роботи поставлено низку завдань, що включали клонування гену тРНК<sup>Pro</sup>*Ef*, розробку методики експресії і очищення транскрипта тРНК<sup>Pro</sup>, створення гібридної тРНК<sup>ProAla</sup> як моделі для дослідження процесів посттрансферного редагування, проведення оцінки внеску виборчого вивільнення аланіл-АМФ та його каталітичного розщеплення за претрансферного редагування ПроРС, перевірку впливу на ефективність претрансферного редагування тРНК<sup>Pro</sup>, встановлення ключових структур, задіяних в цьому процесі, отримання набору мутантних по редагуючому домену форм ПроРС*Ef* та проведення за їх допомогою експериментальної оцінки функціонального значення окремих амінокислотних залишків. Визнано за доцільне перевірити характер участі аланіл-тРНК<sup>Pro</sup> у каталізі посттрансферного редагування ПроРС*Ef* шляхом її модифікації. Вагомою складовою запланованої роботи видається співставлення отриманих експериментальних даних з даними комп'ютерного моделювання механізму посттрансферного редагування ПроРС*Ef* аланіл-тРНК<sup>Pro</sup>.

Отже, як видно з наведеного переліку, йдеться про виконання комплексу досліджень, що потребують як високої обізнаності з найсучаснішими даними з молекулярної біології, так і вільного володіння широким набором дослідницьких методів. Запропонована деталізація завдань роботи повною мірою відповідає поставленій меті і заперечень не викликає.

Дисертація побудована за традиційною схемою і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, експериментальної частини, аналізу та узагальнення результатів, висновків та списку літературних джерел.

Як впливає з огляду літературних джерел, автор належним чином ознайомився з сучасними уявленнями про механізми забезпечення належної відповідності зростаючого поліпептидного ланцюга генетичному коду. Найбільшої уваги приділено процесам редагування помилково синтезованих кон'югатів транспортних РНК та невідповідних їх специфічності амінокислот, тобто механізмам посттрансферного редагування.

Методична частина роботи заслуговує особливого схвалення, оскільки являє собою блискучий набір найсучасніших препаративних та дослідницьких методів біохімії та молекулярної біології, сайт-спрямованого мутагенезу, ферментативної модифікації та різноманітних методів радіоактивного мічення. Заслуговує на схвалення й застосоване автором співставлення власних експериментальних результатів з комп'ютерним моделюванням відповідних процесів.

Внаслідок проведеного багатопланового та виконаного на високому методичному рівні дослідження отримано нові дані, що не лише істотно поглиблюють уявлення про шляхи та механізми пре- та посттрансферного редагування аміноацил-тРНК, але й збагачують методичну базу для виконання молекулярно-біологічних досліджень. Автором вперше показано тРНК-залежне претрансферне редагування у АРС другого структурного класу, доведено провідну роль у цьому процесі гідроксильних груп А76 тРНК<sup>GPro</sup>. Доказово встановлено, що участь 2'-гідроксильної групи А76 тРНК<sup>GPro</sup> в претрансферному редагуванні не обмежується участю в зв'язуванні і позиціонуванні А76 тРНК<sup>GPro</sup> у аміноацилюючому активному центрі. Показано каталітичну природу тРНК-залежного і тРНК-незалежного претрансферного редагування *ProPCEf*, при чому належної уваги приділено й частковому виборчому вивільненню аланіл-АМФ за відсутності тРНК<sup>GPro</sup>. Вичерпним сайт-спрямованим мутагенезом редагуючого активного центру *ProPCEf* визначено внесок різних амінокислотних залишків в процес посттрансферного редагування. Зокрема, з застосуванням двох відмінних між собою експериментальних моделей доведено функціональну роль 2'-

гідроксильної групи A76 тРНК<sup>Pro</sup> в цьому процесі. Вперше на основі повнорозмірної моделі структури комплексу ПроPCEf з аланіл-тРНК<sup>Pro</sup> експериментально підтверджено квантово-хімічну модель посттрансферного редагування ПроPCEf, виявлено її істотні відмінності від відомої з літератури. Таким чином, можна вважати доведеним кислотно-основний субстрат-асистований механізм каталізу гідролізу аланіл-тРНК<sup>Pro</sup>, визначено роль в цьому процесі окремих структурних груп ферменту.

Розглянута робота виконана на найсучаснішому науково-методичному рівні. При цьому необхідно підкреслити саме доказовий характер отриманих даних, узгоджене застосування різнопланових методів. Висновки роботи повною мірою відповідають отриманим результатам і заперечень не викликають. Наукові здобутки роботи опубліковано в 5 статтях в фахових наукових журналах, їх неодноразово доповідали на вітчизняних та міжнародних з'їздах та конференціях.

Принципових зауважень до роботи немає. Щоправда, хотілось би почути відповіді на наступні запитання:

1. З чим пов'язана відсутність даних мутаційного аналізу претрансферної редагуючої активності?
2. У чому полягала специфіка методики аналізу посттрансферної редагуючої активності мутантної форми ПроРС K279A, що далеко вибивається з ряду інших?
3. На чому ґрунтується положення про відсутність доступу води до гібридної аміноацил-тРНК у редагуючому активному центрі фермента при 2'-дезоксидифікації A76 аланіл-тРНК<sup>ProAla79</sup>?

Оцінюючи ж роботу в цілому, повинен відмітити, що поставлені в роботі завдання успішно виконано, а сама робота являє собою виконане на високому науково-методичному рівні завершене дослідження. Тому вважаю, що за актуальністю, обсягом і змістом проведених досліджень, науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів дисертаційна робота Бояршина Костянтина Сергійовича "Структурно-функціональні

основи редагуючої активності проліл-тРНК синтетази з *Enterococcus faecalis*” відповідає вимогам п.п. 11,13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент – завідувач лабораторії біохімії  
ДУ “Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України”,  
доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

*СВ*

Верьовка С.В.

Підпис *Верьовка С.В.*  
ЗАСВІДЧУЮ  
Зав. відділом кадрів

*Верьовка С.В.*

