

ВІДЗИВ офіційного опонента

на дисертаційну роботу **НОВОСИЛЬНОЇ** Олександрі Валеріївни
"Структурні та функціональні відмінності ізоформи А1 та протоонкогенної
ізоформи А2 фактора елонгації трансляції eEF1A", представлену до захисту на
здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю
03.00.03 – молекулярна біологія

Вивчення структурно-функціональних властивостей молекулярних компонентів системи білкового синтезу, а також їхньої участі у позатрансляційних процесах, є важливим напрямком сучасної молекулярної біології, який має велике значення для розуміння закономірностей функціонування біологічних систем. Важлива роль у процесі трансляції належить фактору елонгації eEF1A, який забезпечує завантаження аміноацил-тРНК в А-сайт рибосоми. При цьому, фактор існує у вигляді двох взаємовиключних тканинспецифічних ізоформ – А1 (у клітинах більшості тканин) і А2 (у м'язових та нервових клітинах). Питання про те, навіщо в клітинах різних типів потрібні різні ізоформи універсального фактора трансляції, залишається незрозумілим. З'ясуванню цього питання шляхом порівняння структурних особливостей ізоформ А1 і А2 та їхніх взаємодій з низкою білків і присвячена дисертаційна робота О. В. Новосильної. Зважаючи на вагоме теоретичне значення поставленого питання, а також на залучення ізоформи А2 до канцерогенезу у випадку її експресії у невласивих для неї тканинах, тема дисертаційної роботи безперечно є **актуальною**.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень лабораторії біосинтезу білка відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Дисертація, що побудована за загальноприйнятою схемою, містить 127 сторінок, ілюстрована 46 рисунками і 2 таблицями, список використаних джерел містить 174 посилання, серед яких добре представлено роботи останніх років. Загалом, дисертація добре оформлена.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 23 публікації, в

тому числі 10 статей у фахових наукових журналах: 9 статей надруковано в журналах, що входять до наукометричної бази даних Scopus, серед них 5 – у журналах з імпаکت-фактором на рівні між 2 і 4. Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо функціонального значення ізоформ білків, особливостей фактора трансляції eEF1A та деяких його можливих партнерів є стислим, але змістовним – таким, що демонструє високий рівень теоретичної підготовки автора.

У роботі використано надзвичайно широкий набір сучасних методів молекулярної біології та суміжних наук, описаних у Розділі 2: хроматографія, гель-електрофорез, вестерн-блотинг, імунопреципітація, методи роботи з культурами клітин, аналітичне ультрацентрифугування, розсіяння рентгенівських променів, флуоресцентна спектроскопія, круговий дихроїзм, диференційна скануюча мікрокалориметрія, конфокальна мікроскопія і мікроскопія атомних сил, методи молекулярного моделювання та інші. Висока якість проведених експериментів не викликає сумніву.

Робота О. В. Новосильної мала на меті з'ясувати відмінності між двома ізоформами фактора трансляції eEF1A шляхом порівняння їхніх структурних особливостей і взаємодій з білками-партнерами. Отримані результати представлені у двох підрозділах розділу 3.

У першому підрозділі наведено результати дослідження структурних відмінностей між двома ізоформами за допомогою широкого набору методів. Зокрема, за даними диференційної скануючої мікрокалориметрії, глобулярна структура ізоформи A1 характеризується суттєво нижчою стабільністю і нижчим ступенем кооперативності термічної денатурації у порівнянні з ізоформою A2. Ці результати корелюють з більш високою чутливістю ізоформи A1 до сечовини (за даними малокутового розсіювання рентгенівських променів) та більш високим рівнем гідрофобності поверхні A1 (за даними флуоресцентного титрування білків флуоресцентним зондом АНС). Остання обставина підтверджується також дослідженням двох ізоформ методами

малокутового розсіювання рентгенівських променів і ультрацентрифугування, які вказують на підвищену здатність ізоформи A1 утворювати гомодимери. Загалом, отримані автором результати переконливо свідчать, що ізоформа A1 характеризується певною недоструктурованістю, що робить цей білок імовірним кандидатом для ефективних взаємодій з іншими білками-партнерами.

Таке припущення повністю підтверджується у другому підрозділі. Представлені в ньому результати свідчать, що ізоформа A1, на відміну від A2, здатна взаємодіяти з Ca^{2+} -зв'язувальним білком кальмодуліном, причому ця взаємодія суттєво знижує спорідненість фактора трансляції до тРНК. На мій погляд, це є найбільш цікавим результатом дисертаційної роботи: як справедливо зазначає автор, наявність нечутливої до Ca^{2+} ізоформи A2 у м'язових клітинах і нейронах забезпечує стабільний рівень білкового синтезу незалежно від властивих цим клітинам коливань концентрації Ca^{2+} . Проте, зміст другого підрозділу не вичерпується тільки цим результатом: автором визначено кальмодулін-зв'язувальні структурні домени eEF1A1, побудовано структурну модель комплексу eEF1A1 з кальмодуліном, досліджено особливості взаємодії двох ізоформ з актином та вплив цих взаємодій на полімерізацію актину, показано різну здатність двох ізоформ взаємодіяти з іншим Ca^{2+} -зв'язувальним білком, а також з білком Sgt1, залученим до обміну Ca^{2+} , антивірусного захисту та інших клітинних процесів.

У Розділі 4, який присвячено аналізу отриманих результатів, автор, обговорюючи їх у загальному контексті даних інших дослідників, пропонує пояснення встановлених закономірностей та обґрунтовує, зокрема, положення про функціональне значення відмінностей між двома ізоформами фактора трансляції eEF1A.

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи О. В. Новосильної полягає в тому, що в ній отримані нові вагомні результати щодо залучення ізоформ еукаріотичного фактора трансляції eEF1A до регуляції різноманітних клітинних процесів. Найбільш важливий результат роботи – отримання

відповіді на питання, навіщо в клітинах різних типів потрібні різні ізоформи універсального фактора трансляції. Представлені у роботі дані поглиблюють уявлення про молекулярні механізми регуляції клітинних процесів і відкривають шлях для подальших досліджень ролі ізоформи eEF1A2 у канцерогенезі. Наведені у дисертації результати і висновки знайдуть застосування перш за все в наукових дослідженнях у галузі молекулярної біології, що проводяться в академічних, освітніх та медичних установах, які працюють над вивченням механізмів трансляції, регуляції клітинних процесів і канцерогенезу.

Використання сучасних експериментальних методів, застосування експериментальних підходів, що доповнюють один одного, ретельне виконання експериментів, узгодження отриманих результатів з існуючими експериментальними даними і висновками інших авторів дозволяють констатувати **достовірність експериментальних результатів та обґрунтованість наукових висновків.**

Загалом, дисертація демонструє надзвичайно високий рівень кваліфікації автора – володіння сучасними методами, здатності аналізувати свої результати та узагальнювати їх. Разом з тим, до дисертаційної роботи О. В. Новосильної виникли наступні **зауваження та запитання.**

1. Як зазначено у Вступі, ізоформа фактора трансляції eEF1A2 має онкогенні властивості у випадку появи цього білка у невласних для нього клітинах. Цей факт, безперечно, заслуговує на обговорення, що і зроблено автором роботи. Проте, оскільки онкогенні властивості ізоформи A2 в даній роботі не досліджувались, на мою думку, слово "протоонкогенної" виглядає зайвим у назві: назва повинна в точності відображати зміст.

2. Добре відомо, що фактор трансляції eEF1A може існувати у двох структурних станах, залежних від типу зв'язаного нуклеотиду: у "закритому" (GTP-залежному) стані фактор має спорідненість до аміноацил-тРНК і рибосоми, у "відкритому" (GDP-залежному) дисоціює від рибосоми після завершення процесу завантаження аміноацил-тРНК. З тексту дисертації можна зрозуміти, що в більшості випадків (або в усіх випадках?) мова йде про

відкритий структурний стан обох ізоформ. На жаль, ця обставина чітко не зазначена у тексті ані при описі результатів, ані при їхньому обговоренні. Це має відношення і до інтерпретації результатів: автор постійно наголошує на структурних відмінностях двох ізоформ, але зрозуміло, що відмінності стосуються відкритих структурних станів – неможливо уявити суттєві структурні відмінності у закритих (основних функціонально активних) станах двох ізоформ.

3. На рис. 3.7, 3.8 і вставці рис. 3.3 представлено криві малокутового розсіювання рентгенівських променів для двох досліджених ізоформ у координатах Гінґс. При однакових абсцисах, ордината графіків на вставці рис. 3.3 суттєво відрізняється від ординат на рис. 3.7, 3.8. У чому причина такої різниці?

4. У дисертаційній роботі представлено результати мікроскопічного дослідження колокалізації у клітинах фактора трансляції eEF1A1 з кальмодуліном (рис. 3.14) і білком Sgt1 (рис. 3.29). Але в обох випадках можна бачити більш-менш рівномірний розподіл по цитоплазмі клітини двох партнерів, взаємодія між якими продемонстрована *in vitro*. Навряд чи ці результати можна розглядати як доказ колокалізації. Взагалі, навряд чи має сенс досліджувати колокалізацію рівномірно розподілених по цитоплазмі білків у такий спосіб.

5. У роботі зустрічаються деякі некоректні вирази, неточності і т.п. Наприклад,

– У літературному огляді (стор. 18) зазначено, що дві ізоформи фактора eEF1A є "на 97% гомологічними" – напевно, мова йде про ступінь *подібності* амінокислотних послідовностей, гомологія не є кількісним параметром.

– Не зовсім зрозумілим є підпис до рис. 3.36: на частині (a) рисунку зображено кілька орієнтацій TRP-домену білка Sgt1, якій з них відповідає орієнтація на частині (d)?

– Важко погодитись із твердженням про те, що "заміна кількох амінокислотних залишків кардинально міняє просторову організацію білка" (стор. 96) – окремі амінокислотні заміни *можуть* призводити до суттєвих структурних змін, але зовсім не завжди.

Наведені зауваження жодним чином не впливають на загальну *надзвичайно високу* оцінку розглянутої роботи.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Новосильної Олександри Валеріївни "Структурні та функціональні відмінності ізоформи A1 та протоонкогенної ізоформи A2 фактора елонгації трансляції eEF1A" є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів, глибиною розкриття поставлених проблем, логічністю і обґрунтованістю висновків дисертація повністю відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567, які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент,
доктор біологічних наук, професор,
професор ННЦ "Інститут біології та медицини"
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка



А. В. Сиволоб

Підпис проф. А. В. Сиволоба засвідчую

Заст. директора ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка



Кашаляк Я. А.