

## ВІДЗИВ

### офіційного опонента

на дисертаційну роботу РИБАК Марії Юріївни

"Роль аміноацил-тРНК синтетаз та D-аміноацил-тРНК деацилази у забезпеченні стереоспецифічної селекції амінокислот у процесі трансляції", представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

З'ясування молекулярних механізмів виникнення і підтримання стереоспецифічного відбору амінокислот при білковому синтезі залишається однією з найскладніших фундаментальних проблем молекулярної біології. Відомо, що важлива роль у редагуванні помилково приєднаних до тРНК D-амінокислот належить аміноацил-тРНК-синтезам (АРСазам) та D-аміноацил-деацилазам (ДТД), але детальні механізми такого редагування недостатньо вивчені. Комплексному систематичному дослідженню редагувальних активностей цих двох класів ферментів і присвячено дисертаційну роботу М. Ю. Рибак. Зважаючи на те, що D-амінокислоти мають перспективи використання у синтетичній біології для створення нових фармакологічних препаратів на основі D-амінокислотних пептидів, тема дисертаційної роботи безперечно є **актуальною** не тільки у фундаментальному, а й у прикладному аспекті.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Дисертація, що побудована за загальноприйнятою схемою, містить 169 сторінок, ілюстрована 49 рисунками і 9 таблицями, список використаних джерел містить 203 посилання, серед яких переважають роботи останніх років. Загалом, дисертація добре оформлена.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 22 публікації, в тому числі 5 статей у фахових наукових журналах, які

входять до наукометричної бази даних Scopus, серед них 3 – у журналах першого квартилю (Q1), сумарний імпаکت-фактор журналів перевищує 20. Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо характеристики АРСаз і ДТД, процесів контролю стереоспецифічності відбору амінокислот при білковому синтезі і низки суміжних питань є стислим, але надзвичайно змістовним – таким, що демонструє високий рівень теоретичної підготовки автора.

У роботі використано надзвичайно широкий набір сучасних методів молекулярної біології, описаних у Розділі 2: різноманітні хроматографічні методи, гель-електрофорез, вестерн-блотинг, сайт-спрямований мутагенез, ферментативна модифікація тРНК, методи ферментативної кінетики, біоінформатичні методи та інші. Висока якість проведених експериментів не викликає сумніву.

Робота М. Ю. Рибак мала на меті з'ясувати роль трьох ферментів *Thermus thermophilus* – тирозил-тРНК-синтетази (ТирРС), аланіл-тРНК-синтетази (АлаРС) і ДТД – у контролі стереоспецифічного відбору амінокислот на дорибосомному етапі білкового синтезу. Отримані результати представлені у семи підрозділах розділу 3.

У першому підрозділі наведено результати дослідження процесу приєднання D-Тур до тРНК за участі ТирРС *T. thermophilus*. На першому етапі за допомогою транскрипції *in vitro* автором були отримані препарати тРНК<sup>Тур</sup>, а також її модифіковані похідні, позбавлені ОН-груп при 2'- і 3'-атомах кінцевої рибози. Дослідивши кінетику акцептування амінокислот за участі ТирРС, автор продемонструвала, що місцем акцептування D-Тур слугує 2'ОН-група, тоді як L-Тур може приєднуватись до обох ОН-груп з приблизно рівною імовірністю.

Для вирішення наступних завдань роботи було необхідним отримати рекомбінантну АлаРС *T. thermophilus*. Ефективна процедура, застосована для експресії та очищення ферменту, описана у другому підрозділі. Автором показано, що фермент існує у димерній формі і проявляє належну каталітичну активність.

Каталітичні властивості отриманої рекомбінантної АлаРС ретельно проаналізовані у підрозділі 3.3. Отримані результати свідчать, що фермент може забезпечувати помилкову активацію D-Ala (а також іще кількох неспоріднених амінокислот), як і аміноацилювання тРНК<sup>Ala</sup> цими неспорідненими амінокислотами. При цьому продемонстрована також редагувальна активність АлаРС щодо D-Ala, проаналізоване співвідношення між тРНК-незалежними і тРНК-залежними шляхами редагування і показана переважна важливість останніх.

У четвертому підрозділі описано розроблену автором методику клонування і експресії гена ДТД *T. thermophilus* та очищення відповідного білкового продукту, необхідного для виконання наступного етапу роботи.

Цей наступний етап, що викликає особливий інтерес, представлено у п'ятому і шостому підрозділах. Автором здійснено сайт-спрямований мутагенез з метою отримання 12 мутантних форм ферменту із амінокислотними замінами залишків, потенційно важливих для зв'язування субстратів. Слід зазначити – і це є важливою позитивною рисою роботи, – що представлені у дисертації експериментальні дослідження виконані у тісній колаборації з іншими дослідниками, які здійснювали теоретичні розрахунки. Так, вибір амінокислотних замін базувався на розрахунках молекулярної динаміки ДТД у комплексі з аміноацильованою тРНК. Кінетичний аналіз редагувальної активності мутантних форм ДТД дозволив визначити залишки, важливі для

зв'язування субстрату. Крім того, використання модифікованих тРНК дозволило з'ясувати роль ОН-груп 3'-кінцевої рибози у процесі деацилювання D-Тур-тРНК<sup>Tyr</sup>. Ця робота, знову, виконана у співпраці з дослідниками, що проводили квантово-хімічні розрахунки з метою з'ясувати механізми каталізу (їхні результати обговорюються у розділі 4). Теоретичні і експериментальні результати чудово узгоджуються одне з одним: обидва підходи демонструють ключову роль 2'ОН-групи 3'-кінцевої рибози тРНК у каталізі.

У цьому підрозділі автор знову повертається до АлаРС з метою продемонструвати можливість посттрансферного редагування помилково утворених D-Ala-тРНК<sup>Ala</sup> за участі цього ферменту. За представленими даними, таке редагування дійсно реалізується. Паралельно була продемонстрована активність ДТД щодо деацилювання L-Ala-тРНК<sup>Ala</sup> на відміну від D-Ala-тРНК<sup>Ala</sup>.

У Розділі 4, який присвячено аналізу отриманих результатів, автор, обговорюючи їх у загальному контексті даних інших дослідників, пропонує пояснення встановлених закономірностей. Особлива увага приділяється порівнянню отриманих експериментальних результатів та квантово-хімічних розрахунків і результатів моделювання молекулярної динаміки. Такий комбінований підхід дозволив з'ясувати тонкі механізми каталізу деацилювання помилково утворених D-аміноацил-тРНК за участі ДТД. Крім того, автор узагальнює свої дані щодо ролі ОН-груп 3'-кінцевої рибози тРНК у контролі стереоспецифічності аміноацилювання тРНК, обґрунтовує загальну схему такого контролю за участі АРСаз і ДТД і формулює еволюційну гіпотезу щодо різних можливих сценаріїв виникнення стереоселективного відбору амінокислот.

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи М. Ю. Рибак полягає в тому,

що в ній отримані нові вагомі результати щодо залучення АРСаз і ДТД до контролю стереоспецифічності відбору амінокислот на дорибосомних етапах білкового синтезу. Напевно найбільш важливий результат роботи – з'ясування подвійної ролі 2'ОН-групи 3'-кінцевої рибози тРНК як первинного місця приєднання D-амінокислот і ключового елементу каталізу відщеплення таких амінокислот. Представлені у роботі дані поглиблюють уявлення про молекулярні механізми забезпечення стереоспецифічного відбору амінокислот при білковому синтезі і відкривають шлях для подальших досліджень у цьому напрямі. 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, еволюції та біотехнологічними розробками у галузі синтетичної біології.

Використання сучасних експериментальних методів, застосування експериментальних підходів, що доповнюють один одного, ретельне виконання експериментів, узгодження отриманих результатів з існуючими експериментальними даними, теоретичними розрахунками 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 логічно будувати власне дослідження та вирішувати складні дослідницькі завдання, тісно співпрацювати з фахівцями у суміжних галузях, аналізувати свої результати та узагальнювати їх. **Принципових зауважень до роботи немає.** Під час ознайомлення із дисертаційною роботою виникло тільки кілька **запитань** загального плану.

1. Як видно з рис. 3.23, амінокислотні залишки у складі ДТД, важливі для зв'язування субстрату, є (що не дивно) надзвичайно консервативними, а отже напевно знаходяться під достатньо жорстким контролем очищувального добору. При цьому, у *T. thermophilus* відбулась заміна Phe у 125 положенні на Tyr, що призвело, за даними автора, до суттєвого зниження активності фермента. Можливо, вказана заміна є результатом генетичного дрейфу (хоча добір є більш ефективним еволюційним фактором у бактерій). З іншого боку, ця заміна може мати якийсь біологічний сенс. Хотілося б почути думку автора з цього приводу.

2. Чи можна якось оцінити, враховуючи всі редагувальні механізми, частоту присутності D-амінокислот в білках? Чи відомо щось про можливі механізми "відбракування" таких білків шляхом протеолітичної деградації?

3. Представлені у роботі дані переконливо свідчать про ключову роль 2'ОН-групи кінцевої рибози тРНК у каталізі деацилювання за допомогою ДТД. Як відомо, та сама група задіяна у каталізі транспептидації на рибосомі. Чи можна припустити якусь роль цієї групи у дискримінації D-амінокислот на рибосомному етапі білкового синтезу?

Зрозуміло, що наведені запитання 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 Рибак Марії Юріївни "Роль аміноацил-тРНК синтетаз та D-аміноацил-тРНК деацилази у забезпеченні стереоспецифічної селекції амінокислот у процесі трансляції" 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

