

ВІДЗИВ офіційного опонента

на дисертаційну роботу ЗАРУДНОЇ Маргарити Іванівни
"Структурні переходи в гомополірибонуклеотидах та їхнє біологічне значення",
представлену до захисту на здобуття наукового ступеня доктора біологічних
наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Вивчення залежних від нуклеотидної послідовності і зовнішніх умов структурних та фізико-хімічних властивостей нуклеїнових кислот залишається надзвичайно важливими напрямком сучасної молекулярної біології, який має велике значення для розуміння закономірностей регуляції біологічних процесів. Дисертаційна робота М. І. Зарудної присвячена дослідженню структурних переходів у гомополірибонуклеотидах – елементах послідовності, що достатньо часто зустрічаються у природних нуклеїнових кислотах. За яких умов відбуваються різноманітні конформаційні переходи в гомополімерних треках нуклеїнових кислот? Як впливають поліелектролітні властивості нуклеїнових кислот на таку конформаційну рівновагу? Яке біологічне значення можуть мати неканонічні конформації гомоолігонуклеотидів? Всі ці питання, що залишаються недостатньо з'ясованими, знаходяться у центрі уваги автора роботи. Оскільки дослідження такого кола питань є вкрай важливим для розуміння молекулярних механізмів функціонування нуклеїнових кислот, тема дисертаційної роботи є, без жодних сумнівів, **актуальною**.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень відділу молекулярної та квантової біофізики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, а також підтримана кількома українськими та міжнародними грантами.

Дисертацію побудовано за загальноприйнятою схемою, викладено на 312 сторінках, ілюстровано 96 рисунками і 16 таблицями, список використаних джерел містить 355 посилань, серед яких переважають роботи останніх років. В цілому дисертація добре оформлена.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 49 публікацій, в

тому числі 1 розділ у міжнародній науковій монографії і 29 статей у фахових наукових журналах. При цьому 25 статей надруковано в журналах, що входять до наукометричної бази даних Scopus, одна з них – у журналі з імпаکت-фактором біля 9, чотири – біля 3, одна – біля 1. Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо структурних переходів у гомополірибонуклеотидах і розповсюдженості гомонуклеотидних треків у природних нуклеїнових кислотах є стислим, але надзвичайно змістовним.

У роботі використано методи молекулярної біології і біофізики, описані у Розділі 2: осмометрія, оптична спектроскопія, аналітичний електрофорез, аналіз протонної буферної ємності, а також методи передбачення вторинної структури РНК та інші біоінформатичні методи. Загальна висока якість проведених експериментів і теоретичних досліджень не викликає сумніву.

Робота М. І. Зарудної мала на меті провести систематичне дослідження фізико-хімічних і конформаційних властивостей гомополірибонуклеотидів різних типів, а також проаналізувати можливість і біологічне значення конформаційних переходів у гомонуклеотидних треках у складі природних нуклеїнових кислот. Поліелектролітні властивості нуклеїнових кислот є багато в чому визначальними для розуміння їхньої фізичної поведінки і біологічного значення. У цьому плані важливою частиною роботи є викладені у Розділі 3 результати щодо визначення методом осмометрії залежності ефективного діаметра дволанцюгових нуклеїнових кислот від іонної сили розчину. Ці дані, які широко використовуються при описі різноманітних аспектів фізичної поведінки молекул ДНК, були отримані автором вперше і мають бути визнаними як вагомий здобуток.

Наступний Розділ 4 присвячено систематичному дослідженню залежних від поліелектролітних властивостей конформаційних переходів у гомополімерах нуклеїнових кислот методами електрофорезу і протонної буферної ємності. Слід зазначити, що звертає на себе увагу саме систематичність та скрупульозність цього дослідження. В основному вивчались

полімери полі(A), полі(G) і полі(C). У розділі представлено багатий матеріал щодо залежності електрофоретичної рухливості гомополімерів від іонної сили і рН розчину, досліджено взаємодію гомополімерів з деякими амінокислотами, проаналізовано криві протонної буферної ємності гомополінуклеотидів, з'ясовано умови конформаційних переходів у гомополімерах, запропоновано механізми утворення двох різних одноланцюгових і двох дволанцюгових форм полі(A), так званої "замороженої" форми полі(A), чотириланцюгової форми полі(C) тощо. Отримані результати слугують вагомим підґрунтям для подальших досліджень, спрямованих на поглиблення розуміння біологічної ролі гомоолігонуклеотидних треків у складі нуклеїнових кислот.

Обґрунтуванню низки гіпотез щодо такої ролі присвячено Розділ 5. Автор пропонує можливу участь внутрішніх подвійних спіралей, утворених полі(A)-треками у складі мРНК, у регуляції процесингу мРНК і білкового синтезу. Досить переконливо виглядає гіпотеза щодо участі G-квадруплексів в димеризації молекул РНК вірусу імонодефіциту людини. Цікавим є і припущення щодо ролі G-квадруплексів, які, на думку автора, можуть утворюватись у зоні поліА-сигналів пре-мРНК, у регуляції інтегрованого процесу термінації транскрипції і поліаденилування мРНК. Проведений автором біоінформатичний аналіз і передбачення вторинної структури мРНК свідчить на користь висловлених гіпотез і робить їх вартими експериментальної перевірки.

Останній Розділ 6 представляє ще одне важливе досягнення роботи – створення бази даних поліА-сигналів пре-мРНК людини. Проведений автором аналіз цієї бази свідчить про значну варіабельність послідовностей як самих поліА-сигналів, так і допоміжних послідовностей, що їх оточують. Зокрема, в області частини поліА-сигналів автором знайдено гомонуклеотидні послідовності, здатні утворювати G-квадруплекси і і-мотиви. Загалом, отримані автором результати сприяють розвитку уявлень про механізми термінації транскрипції – процесу, розуміння якого все ще залишається далеким від остаточного.

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи М. І. Зарудної полягає в тому, що в ній отримано нові результати щодо поліелектролітних властивостей нуклеїнових кислот, конформаційного поліморфізму гомонуклеотидних треків у їхньому складі і можливих механізмів участі таких треків у регуляції біологічних процесів. Представлені у роботі дані поглиблюють уявлення про структурно-динамічні властивості нуклеїнових кислот і біологічну роль їх неканонічних структурних форм. Отримані результати можуть бути використані при розробці нових терапевтичних засобів, а також у нанобіотехнологіях. Результати щодо залежності ефективного діаметру двоспиральних нуклеїнових кислот від іонної сили широко використовуються при молекулярному моделюванні. Наведені у дисертації результати і висновки знайдуть застосування перш за все в наукових дослідженнях у галузі молекулярної біології і біофізики, а також у практичних розробках, що проводяться в академічних, освітніх та медичних установах, які працюють над вивченням нуклеїнових кислот і механізмів регуляції експресії генів.

Використання сучасних експериментальних і теоретичних методів, велика кількість проведених експериментів і теоретичних розробок, застосування підходів, що доповнюють один одного, узгодження отриманих результатів з існуючими експериментальними даними і висновками інших авторів не залишають жодних сумнівів у **достовірності експериментальних результатів та обґрунтованості наукових висновків**.

Загалом, дисертація справляє надзвичайно приємне враження обсягом представлених результатів та високим рівнем виконання. Разом з тим, до дисертаційної роботи М. І. Зарудної виникають наступні **зауваження та запитання**.

1. Хоча наведений у роботі рис. 3.7 (вплив іонної сили на персистентну довжину ДНК) жодним чином не впливає на основні висновки автора, слід зауважити, що цей рисунок не можна вважати таким, що відображає "сумарні літературні дані" з цього питання. Рисунок взято із досить дискусійної роботи

Меннінга [219]: більшість експериментальних даних свідчить про незмінність персистентної довжини ДНК при іонній силі більше ~ 10 мМ.

2. У тій частині роботи, що виконана методом електрофорезу, представлено тільки результати сканування гелів. Зрозуміло, що саме така форма представлення є найбільш інформативною, але хотілося б також бачити, у якості ілюстрації, приклади зображення самих гелів після електрофорезу і фарбування.

3. Як свідчить рис. 4.5, коефіцієнт затримки полірибонуклеотидів при електрофорезі знижується при підвищенні іонної сили до ~ 20 мМ і далі залишається майже незмінним при подальшому зростанні концентрації солі. Така поведінка дійсно схожа (як зазначає автор) на залежність від іонної сили персистентної довжини ДНК, але вона зовсім не схожа (всупереч твердженню автора) на залежність від іонної сили ефективного діаметра ДНК, представлену на рис. 3.6.

4. На рис. 4.24 концентрації різних форм полі(А) наведені у відносних одиницях (практично, мова йде про частки різних форм). Навіщо тоді відносити *відносну* концентрацію c_2 до c (у підписі до рисунка і тексті, що його стосується)? І що таке c ? Якщо це сумарна концентрація, то у прийнятих автором позначеннях вона просто дорівнює 1?

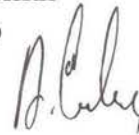
5. У тексті зустрічається не зовсім коректна термінологія: досить часто мова йде про "одноланцюгові спіралі", "односпіральні" форми або навіть про "чотириланцюгові спіралі". Чотириланцюгові форми – квадруплекси – не характеризуються спіральною конфігурацією, одноланцюгові нуклеїнові кислоти, хоча й можуть набувати спіральних конформацій у кристалах, у розчині, швидше за все, знаходяться у неупорядкованих клубкових конформаціях.

Зрозуміло, що наведені зауваження не носять принципового характеру і не впливають на загальну *високу оцінку* розглянутої роботи.

Оцінюючи роботу в цілому, можна констатувати, що дисертація М. І. Зарудної є завершеним дослідженням в актуальній області молекулярної біології та містить ряд важливих наукових результатів, які у сукупності є суттєвими для розвитку молекулярної біології нуклеїнових кислот.

Враховуючи актуальність та обсяг проведених досліджень, наукову новизну одержаних результатів, обґрунтованість висновків, перспективи наукового та практичного застосування, вважаю, що дисертаційна робота Зарудної Маргарити Іванівни “Структурні переходи в гомополірибонуклеотидах та їхнє біологічне значення” **повністю відповідає вимогам** постанови КМ України від 24 липня 2013 року №567 “Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника”, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент,
доктор біологічних наук, професор
професор кафедри загальної та молекулярної генетики
ННЦ "Інститут біології" Київського національного
університету імені Тараса Шевченка



А. В. Сиволюб

Підпис проф. А. В. Сиволюба засвідчую

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



(Балаба П.Г.)