

## 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 сьомому 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 деацилування 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



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 засвідчує



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