

ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертаційну роботу РИБАК Марії Юрїївни “Роль аміноацил-тРНК синтетаз та D-аміноацил-тРНК деацилази у забезпеченні стереоспецифічної селекції амінокислот у процесі трансляції”, подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія:

Забезпечення стереоселективності синтезу молекулярних складових живої природи становить ключову грань, що забезпечує поділ між живою та неживою природою. При цьому, незважаючи на багаторічні дослідження, існує безліч питань, що не мають скільки-небудь обґрунтованого пояснення. Так, у випадку біосинтезу білка лишається незрозумілим, чому з кількох сотень наявних в організмі амінокислот кодуються генетичним кодом та є протейногенними є лише 20, чому всі ці амінокислоти містять аміногрупу в α -положенні та (за винятком гліцину) належать до стеричного L-ряду. Донедавна вважали, що D-стереомерів протейногенних амінокислот в живому організмі не існує, однак наукові здобутки останніх десятиріч спростували цю хибну думку. Виявлено, що ці ізомери утворюються в організмі в досить значних кількостях та беруть участь в різноманітних метаболічних процесах. Зрозуміло, що випадкове включення в структуру білка хоча б одної амінокислоти D-ряду неодмінно призведе до формування структурно хибної а, отже, й функціонально неповноцінної молекули, здатної обумовити незлічені ускладнення перебігу фізіологічних процесів. Тому виключення подібного роду помилок є критичною умовою для нормального процесингу білка. Тож будь-які дослідження механізмів забезпечення стереоселективності процесу трансляції становлять безсумнівний інтерес як з науково-пізнавальної, так і з практичної точок зору.

Мета дисертаційної роботи полягала у вивченні ролі аміноацил-тРНКсинтетаз у забезпеченні стереоспецифічної амінокислота з'ясуванні механізму гідролізу субстратів тРНК з активованими D-амінокислотами за допомогою D-аміноацил-тРНКдеацилази. Тобто дослідження присвячене двом чільним процесам забезпечення стереоселективності біосинтезу білка на дорибосомному рівні. Відповідно до мети поставлено цілу низку завдань, що включали розробку методики очищення аланіл-тРНКсинтетази *T. thermophilus* та з'ясування її олігомерної організації; клонування гену D-аміноацил-тРНК-деацилази, розробку методики експресії цього гена в клітинах *E. coli* та процедури очищення рекомбінантного білка; одержання за участі транскриптів тРНК^{Тир}, отримання тРНК дикого типу та двох модифікованих дезокси-форм;

дослідження каталітичних властивостей АлаРС у реакціях активації споріднених та неспоріднених амінокислот та формування аміноацил-тРНК; встановлення ролі 2'- і 3'-ОН груп кінцевого аденозину тРНК^{Тир} при каталітичному аміноацилюванні L- та D-тироzinу; пошук амінокислотних залишків активного центру досліджуваної D-аміноацил-тРНКдеацилази методами біоінформатичного аналізу та сайт-спрямованого мутагенезу; визначення ролі тРНК^{Тир} у процесі гідролізу D-аміноацил-тРНКдеацилазою помилково аміноацильованих D-Тир-тРНК^{Тир} субстратів; порівняння отриманих експериментальних даних із комп'ютерною моделлю; з'ясування можливості посттрансферного редагування помилково аміноацильованих гліцил/D-аланіл-тРНК^{Ала} субстратів за участі АлаРС та D-аміноацил-тРНКдеацилази. Отже, йдеться про багатопланове дослідження, для виконання якого необхідні як оволодіння значним за об'ємом науковим матеріалом, так і залучення широкого набору найсучасніших молекулярно-біологічних та біохімічних методів.

Дисертація побудована за традиційною схемою і містить анотацію, вступу, огляд літератури, методичну частину, результати та їх обговорення, висновки та список використаних джерел. Ознайомлення з оглядом літератури справляє враження належного ознайомлення автором з сучасним станом проблеми, обґрунтованість піднятих в роботі питань та поставлених практичних завдань. Особливої уваги приділено структурно-функціональним властивостям аміноацил-тРНК-синтетази, забезпеченню контролю якості біосинтезу білка, вмісту та ролі амінокислот D-ряду в перебізі різноманітних фізіологічних процесів. Окремого обговорення заслуговує методична частина роботи. Застосовано полімеразну ланцюгову реакцію, сайт-спрямований мутагенез, ферментативну модифікацію тРНК^{Тир}, ізотопне мічення ³²P та ¹⁴C, методи ферментативної та неферментативної кінетики з радіоактивними мітками, електрофорез білків та нуклеїнових кислот, низку хроматографічних методів, Вестерн-блот аналіз, біоінформатичний аналіз, порівняння біохімічних даних з даними комп'ютерного моделювання та квантової хімії. Застосування подібного набору сучасних методів свідчить про виконання дослідження на найвищому рівні. Спільно з належним володінням найсучаснішими науковими даними, це дало змогу отримати вагомі результати, що становлять безсумнівне наукове та практичне значення.

Вперше встановлено субстрат-асистований механізм гідролізу D-Тир-тРНК^{Тир} за участі D-аміноацил-тРНКдеацилази, в якому ключову роль відіграє вільна 2'-гідроксильна група А76 тРНК^{Тир} та беруть участь дві молекули води. Отримані експериментальні дані (сайт-спрямованого мутагенезу активного центру ДТД, ферментативної кінетики із різними

тРНК^{Тир} субстратами) повністю узгоджуються з даними комп'ютерного моделювання щодо запропонованого механізму гідролізу D-Тир-тРНК^{Тир}. Встановлено подвійну роль 2'-ОН групи А76 тРНК^{Тир} в аміноацилюванні D-Тир та гідролізі D-аміноацил-тРНК. Вперше показано здатність АлаРС аміноацилювати тРНК^{Ала} D-Ала та D-Сер. Встановлено рівні активації споріднених (L-Ала) та неспоріднених (Глі, L-Сер, D-Сер, D-Ала) амінокислотмутантною формою АлаРС (С666А) *E. colita* АлаРСТ. *thermophilus*. Вперше продемонстровано тРНК-залежне посттрансферне редагування D-аміноацил-тРНК за участі АРСаз та встановлено, що редагувальний домен АлаРС відповідальний за контроль стереоспецифічності через гідроліз D-Ала-тРНК^{Ала}. Дослідження механізмів редагування за участі АлаРС та ДТД дозволило нам сформулювати еволюційну гіпотезу щодо двох ймовірних сценаріїв стереоселективного відбору амінокислот в апараті трансляції – за участі D-аміноацил-тРНКдеацилази та без неї. Протягом виконання роботи істотно удосконалено методи експресії та очищення досліджуваних ферментів, методи оцінки активності цих ферментів. Подібні удосконалення методів становить безсумнівний інтерес при подальших дослідженнях процесів трансляції. Отримані дані можуть бути екстрапольовано на інші системи, зокрема – для створення пептидів з амінокислотами D-ряду як перспективних фармакологічних засобів.

Статистична обробка отриманих експериментальних результатів виконана на належному рівні і заперечень не викликає. Висновки повною мірою відповідають отриманим результатам. Наукові здобутки дисертаційної роботи опубліковано в 22 наукових роботах, серед яких 5 статей у фахових виданнях та 17 тез у збірниках вітчизняних та міжнародних наукових з'їздів та конференцій.

Принципових зауважень до роботи немає. Нечисленні недоліки оформлення та вжиті автором невдалі вирази відмічено в тексті та можуть бути легко виправлені. Водночас хотілось би почути відповідь пошукувачки на наступні питання:

1. У своїй роботі Ви зосередились на вивченні дорибосомного етапу контролю стереоселективного відбору амінокислот. Який, на Вашу думку, його внесок поряд із рибосомним?
2. З чим може бути пов'язаний феномен гідролізу D-Ала-тРНК^{Ала} субстратів аланіл-тРНК синтетазою?

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які ставляться до кандидатських дисертацій. Оцінюючи роботу в цілому, можна зробити висновок, що вона є цілісним та завершеним дослідженням, котре

істотно поглиблює розуміння механізмів забезпечення стереоселективності процесу трансляції та обумовленого ним формування біологічно активних білків. Вважаю, що розглянута дисертаційна робота є цілісною, закінченою науковою працею, що повною мірою відповідає вимогам п.п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.), що висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор –Рибак Марія Юріївна– 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, професор  - Верьовка С.В.

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ОТОЛАРИНГОЛОГІЇ
ІМ. ПРОФ. О.С. КОЛОМІЙЧЕНКА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»
ЗГІДНО З ОРИГІНАЛОМ



Підпис  С.В.
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. відділом кадрів 