

ВІДГУК

офіційного опонента – кандидата біологічних наук,
старшого наукового співробітника відділу структури та функції білка
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
Корольової Дар'ї Сергіївни

на дисертаційну роботу Бондарчук Тетяни Валеріївни
**«КОМПЛЕКС ФАКТОРІВ ЕЛОНГАЦІЇ ТРАНСЛЯЦІЇ eEF1B
ЛЮДИНИ: СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ І ФУНКЦІОНАЛЬНІ
ВЛАСТИВОСТІ»**, представленої в спеціалізовану вчену раду Д 26.237.01
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України на здобуття
наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 –
молекулярна біологія.

Актуальність вибраної теми дисертації. Незважаючи на тривале та ґрунтовне дослідження молекулярних механізмів синтезу білка, до цього часу питання структурної організації та особливостей функціонування фактора елонгації трансляції eEF1B та його субодиниць залишається відкритим. Щоб відновити активну конформацію eEF1A, потрібен фактор обміну ГДФ на ГТФ на молекулі eEF1A. У вищих еукаріот цю роль виконує комплекс факторів елонгації трансляції eEF1B.

На сьогоднішній день інформація про структуру комплексу факторів елонгації трансляції вищих еукаріот eEF1H є досить суперечливою, а просторові структури субодиниць, які входять до комплексу eEF1B, залишалися невідомими. Таким чином, дослідження структурних та функціональних особливостей комплексу eEF1B є важливими з точки зору фундаментальної науки для розуміння тонких механізмів регуляції процесу синтезу білка.

В той же час за ряду патологій таких як діабет або онкологічні захворювання, експресія субодиниць комплексу eEF1B змінюється. Також спостерігають зміни експресії субодиниць досліджуваного протеїну в онтогенезі. Отже дані щодо функціонування комплексу eEF1B є цінними для медицини і можуть мати важливе діагностичне та терапевтичне значення.

Зважаючи на те, що комплекс eEF1H є надбанням вищих еукаріот, дослідження переваг, які надає клітинам формування цього комплексу із збереженням високо консервативних ділянок протеїнів, які входять до його складу, є цікавим з точки зору молекулярної еволюції.

Враховуючи все вищезазначене, актуальність запропонованої роботи є безсумнівною.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Дисертація відповідає основному плану фундаментальних досліджень, які проводяться у відділі структурної та функціональної протеоміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за бюджетними темами: «Дослідження трансляційних наноконкомплексів та їх компонентів» (2.2.4.9; №0110U000693 2010 – 2015 рр.), «Дослідження факторів елонгації трансляції ссавців у біосинтезі білка та інших клітинних процесах» (2.2.4.9, №0115U003744 2016 - 2020 рр.) та конкурсу «Підтримка досліджень провідних та молодих учених» - «Встановлення особливостей структурної організації комплексу елонгації трансляції eEF1B людини» (2020.02/0028, 2020-2021рр.)

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було встановлення структурної організації комплексу факторів елонгації трансляції eEF1B людини та характеристика структурних особливостей і функціональних властивостей його субодиниць.

Для досягнення мети було поставлено завдання встановити структурну організацію кожної з трьох субодиниць eEF1B, а також створити та охарактеризувати їх вкорочені форми; розкрити механізм підсилюючого впливу субодиниці eEF1B γ на функціональну активність eEF1B α в реакції обміну гуанінового нуклеотиду; перевірити функціональну активність та, спираючись на визначення сайтів взаємодії між субодиницями, встановити стехіометрію субодиниць комплексу eEF1B $\alpha\beta\gamma$ і побудувати атомарну модель його просторової організації.

Наукова новизна одержаних результатів. Авторкою вперше було визначено олігомерний стан (четвертинну організацію) усіх субодиниць комплексу eEF1B *in vitro*. Зокрема, було продемонстровано, що у розчині субодиниця eEF1B α існує як стабільний мономер, eEF1B β – як тример, що забезпечується мотивом типу «лейцинова застібка», а eEF1B γ – представлений сумішшю мономер-димер при концентрації нижче 1,8 мкМ і олігомеризується при підвищенні концентрації. Крім того, авторкою було вперше показано, що N-кінцевий домен субодиниці eEF1B β не має жорстко структурованого ядра і складається з α -спіралей з динамічною організацією. Вперше було створено атомарну модель тримеру eEF1B β та вперше було показано можливість безпосередньої взаємодії обох ізоформ фактора eEF1A з субодиницею eEF1B β .

Авторкою було запропоновано пояснення підсилюючої дії eEF1B γ на активність eEF1B α в реакції обміну гуанінового нуклеотиду та показано, що молекула eEF1B γ є структурним елементом, який з'єднує субодиниці eEF1B α та eEF1B β .

Авторкою було доведено, що субодиниці eEF1B утворюють потрійний комплекс, а всі шість GEF-доменів субодиниці eEF1B α та eEF1B β рознесено у просторі відносно мотиву типу «лейцинова застібка», тобто доступні і взаємодіють з фактором eEF1A2. На основі цих результатів автором вперше визначено склад комплексу eEF1H: eEF1B($\alpha\beta\gamma$)_{3/6} × eEF1A2.

Із практичної сторони отримані експериментальні результати роботи розширюють сучасні уявлення про структурну організацію апарату трансляції людини, характерною відмінністю якого є компартменталізація його компонентів для забезпечення високої ефективності процесу.

Крім того, результати досліджень можуть бути основою розробки нових діагностичних підходів для ряду захворювань, зокрема для онкогенезу.

Матеріали дисертаційної роботи може бути використано в навчальних курсах та спецкурсах по загальній темі «Біосинтез білка» для студентів вищих навчальних закладів.

Структура та обсяг дисертації: дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів дослідження, аналізу та узагальнення результатів, висновків і списку використаної літератури (203 джерела), а її основний зміст викладено на 190 сторінках машинописного тексту; містить 45 рисунків та 3 таблиці.

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми дисертації, вказано зв'язок роботи з науковими програмами, визначено мету, завдання, об'єкт і предмет досліджень, методи дослідження, вказано наукову новизну й практичне значення одержаних результатів, наведено дані щодо апробації та публікацій.

В **огляді літератури**, викладеному на 25 сторінках, наведено матеріал щодо структури та функціонального значення комплексу eEF1B еукаріот, особливостей фактора eEF1A еукаріот та деяких його можливих партнерів. Дані літератури вдало узагальнені авторкою в схеми. Літературний огляд є стислим, але змістовним – таким, що демонструє високий рівень теоретичної підготовки авторки. Детальний аналіз даних літератури дозволив авторці визначити напрямки та основні завдання дисертаційної роботи.

Використані у роботі методи досліджень детально описано у **другому розділі**. Детально описано отримання повнорозмірних та вкорочених субодинць eEF1B з використанням ПЛР, плазмідних конструкцій, трансформації клітин *E. coli* і селекції позитивних клонів з подальшою очисткою цільових протеїнів.

Описано аналітичну гель-фільтрацію протеїнів для оцінки їх молекулярних мас та аналітичне ультрацентрифугування білків для визначення розміру та форми протеїнів. Використано цілий спектр структурних методів.

На окрему увагу заслуговує визначення кінетики заміщення водню на дейтерій в протеїнах з наступним мас-спектрометричним аналізом в поєднанні з біоінформатичним аналізом.

Методи, використані в роботі, не лише сучасні, але й різнопланові. Вважаю, що саме вдале та елегантно поєднання методів молекулярної біології, біохімії, фізхімії та комп'ютерного моделювання дало можливість вирішити поставлені авторкою завдання. Висока якість проведених експериментів не викликає сумніву.

В **третьому розділі** викладено результати, отримані авторкою. Результати структуровано на підрозділи. В **першому підрозділі** визначено структурну організацію субодиниці eEF1Ba і доведено, що повнорозмірна субодиниця eEF1Ba є мономерним білком. Крім того, досліджено феномен пришвидшення обміну гуанінового нуклеотиду субодиницею eEF1Ba в комплексі з eEF1Bγ і показано, що N-кінцевий домен eEF1Ba інгібує зв'язування eEF1A з C-кінцевим доменом eEF1Ba.

У **другому підрозділі** авторкою було вперше показано, що рекомбінантний eEF1Bβ людини є мультидоменним білком. Доведено, що мотив типу «лейцинова застібка» відповідає за тримеризацію eEF1Bβ, а також показано, що всі GEF-домени тримеру eEF1Bβ доступні до взаємодії з фактором eEF1A2.

В **третьому підрозділі** показано, що eEF1Bγ – це білок помірно видовженої форми, який складається з двох компактно згорнутих доменів, з'єднаних між собою довгим неструктурованим лінкерним регіоном. Встановлено, що eEF1Bγ у розчині має схильність до олігомеризації.

В **четвертому та п'ятому підрозділі** авторкою проведена реконструкція комплексу eEF1B, визначено сайти взаємодії між субодиницями комплексу eEF1B та змодельовано структуру комплексу eEF1B. Кульмінацією дисертації є створення моделі четвертинної організації комплексу eEF1B і доведення, що це є тригетеротример, здатний утримувати до шести молекул фактора eEF1A2.

В **узагальненні** обговорено і систематизовано великий обсяг отриманого фактичного матеріалу, узагальнено наведену інформацію, проаналізовано наукові знахідки в контексті їхнього фундаментального значення та різноманітних способів їхнього практичного застосування.

Наведені **висновки** відповідають меті та завданням, поставленим авторкою.

Перелік **використаних джерел літератури** містить 203 посилання українською та англійською мовами.

Наостанок слід зазначити, що в дисертаційному дослідженні ретельно виконано великий обсяг експериментальної роботи. Проведення таких досліджень свідчить про кваліфікацію дисертантки і високий науковий рівень роботи в цілому. Достовірність отриманих в роботі результатів і обґрунтованість положень дисертації забезпечуються широким спектром використаних авторкою надійних сучасних експериментальних методів.

Таким чином, дисертація Бондарчук Тетяни Валеріївни «Комплекс факторів елонгації трансляції eEF1В людини: структурна організація і функціональні властивості» є завершеною науковою роботою.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. За матеріалами дисертації опубліковано 5 статей у фахових наукових журналах, які входять до наукометричної бази даних Scopus (3 з яких належать до першого квартилю (Q1) бази даних Web of Science Core Collection відповідно до класифікації Journal Citation Reports – International Journal of Biological Macromolecules, The FEBS Journal, Nucleic Acids Research) та тези 7 доповідей на наукових конференціях.

Автореферат достатньо відображає найбільш важливі положення дисертації і відповідає її змісту, а зроблені висновки сповна віддзеркалюють досягнення дисертанта.

Дисертаційна робота та автореферат оформлені належним чином і відповідають вимогам державних стандартів і МОН України. Матеріал дисертації викладено ясно і послідовно, ретельно оформлено, ілюстрації виконано на належному рівні.

Поряд з наведеною позитивною оцінкою дисертаційної роботи слід виділити такі основні дискусійні **питання, побажання та зауваження**:

1. Вказано, що електрофоретично визначена чистота отриманих препаратів eEF1В α (розділ 3.1.1.), eEF1В β (розділ 3.2.1.) та eEF1В γ (розділ 3.3.) складала більше ніж 90%. Бажано уточнити, якої саме чистоти препаратів досягнуто, оскільки 10-5% домішок, що визначаються електрофоретично, будуть перешкоджати аналітичному дослідженню цільового протеїна.

2. На мою думку, слід було навести докази того, що протеїни, синтезовані в *E. coli*, набувають нативної конформації, характерної для еукаріот. Тобто довести, що вивчені структурні та функціональні особливості комплексу eEF1В дійсно притаманні еукаріотичним клітинам *in vivo*.

3. Хоча тема, обрана дисертанткою, актуальна, із 203 літературних джерел, лише 9 джерел молодші 5 років.

4. Як в дисертаційній роботі (ст. 54, 61, 64, 67-69, 86, 141 тощо), так і в авторефераті (ст. 6, 7, 10-12, 15-18) в написанні десяткових дробів іноді

використовуються крапки замість ком, передбачених в українському правописі. Це не утруднює розуміння тексту, але створює враження неохайності.

Утім, вищевказані окремі зауваження не впливають на загальну високу оцінку наукового рівня рецензованої дисертації.

Висновок щодо відповідності дисертаційної роботи встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Бондарчук Тетяни Валеріївни «Комплекс факторів елонгації трансляції eEF1B людини: структурна організація і функціональні властивості» 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,
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
відділу структури і функції білка
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України



Д.С. Корольова

Підпис Д.С. Корольова
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
національної академії наук України
"12" 06 2023 р.

