

ВІДГУК
офіційного опонента

на дисертаційну роботу БОНДАРЧУК Тетяни Валеріївни
"Комплекс факторів елонгації трансляції eEF1B людини: структурна
організація і функціональні властивості", представлену до захисту на
здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю
03.00.03 – молекулярна біологія

Молекулярні механізми білкового синтезу є важливою проблемою сучасної молекулярної біології – своєрідним контрапунктом цієї науки. Суттєвим елементом машинерії трансляції є олігомерний комплекс eEF1B, який забезпечує обмін GDP на GTP у складі елонгаційного фактору eEF1A, що у GTP-зв'язаній формі відповідає за завантаження аміноацил-тРНК в А-сайт рибосоми при елонгації трансляції. Дисертаційна робота Тетяни Бондарчук присвячена дослідженню структурної організації комплексу eEF1B людини та його функціональних властивостей. Оскільки питання про структуру eEF1B залишалось недостатньо з'ясованим, тему дисертаційної роботи слід безперечно визнати **актуальною**.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень відділу структурної та функціональної протеоміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, а також підтримана грантом Національного фонду досліджень України.

Дисертація, що побудована за загальноприйнятою схемою, містить 190 сторінок. Дисертація ілюстрована 47 рисунками і 3 таблицями, список використаних джерел містить 203 посилання. В цілому дисертація добре оформлена.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 12 публікацій, в тому числі 5 статей у фахових наукових виданнях (всі відображені у наукометричній базі Scopus). Серед них 3 статті надруковано в журналах, що мають імпакт-фактор на рівні від 5 до 18

(перший квартиль). Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо молекулярних механізмів трансляції, ролі фактору трансляції eEF1A та його кофактору eEF1B, структурної організації та функціональних властивостей субодиниць eEF1B та альтернативних моделей загальної організації комплексу цих субодиниць є стислим, але надзвичайно змістовним – таким, що демонструє високий рівень теоретичної підготовки авторки.

У роботі використано широкий набір сучасних експериментальних методів, а також методів молекулярного моделювання, описаних у Розділі 2: полімеразна ланцюгова реакція і створення плазмідних конструкцій, синтез і очищення рекомбінантних білків, вимірювання кінетики обміну гуанінових нуклеотидів, різні варіанти електрофорезу, аналітична гель-фільтрація і ультрацентрифугування, вимірювання кінетики обміну водню на дейтерій з наступною мас-спектрометрією, спектроскопія кругового дихроїзму, передбачення просторової структури білків і молекулярний докінг тощо. Висока якість проведених експериментів не викликає сумніву.

Робота Тетяни Бондарчук мала на меті встановити структурну організацію фактору елонгації трансляції eEF1B людини та охарактеризувати структурні особливості і функціональні властивості його субодиниць. Отримані результати представлено у п'яти підрозділах Розділу 3.

Перший підрозділ присвячено дослідженню структури і функціональних властивостей субодиниці eEF1B α . За допомогою швидкісного і рівноважного ультрацентрифугування продемонстровано, що ця субодиниця є мономерним білком видовженої форми. Комбінація методів воднево-дейтерієвого обміну і молекулярного моделювання дозволила створити модель просторової структури білка, яка в цілому добре узгоджується з експериментальними даними. Крім того, проаналізовано кінетику реакції обміну гуанінових нуклеотидів за участі

повнорозмірного білка, його вкорочених форм і комплексу білка з субодиницею eEF1V γ та показано, що N-кінцевий домен eEF1V α інгібує обмін, тоді як його видалення або взаємодія з eEF1V γ знімає таке інгібування.

У другому підрозділі представлено результати дослідження другої субодиниці – eEF1V β . За допомогою методів ультрацентрифугування, КД-спектроскопії, водно-дейтерієвого обміну і молекулярного моделювання переконливо показано, що eEF1V β існує у вигляді гомо-тримеру, утвореного у результаті формування структури типу coiled-coil (лейциновий зіпер) трьома α -спіралями, що належать різним мономерам. При цьому кожен мономер, крім зазначеної α -спіралі, що відповідає за тримеризацію, містить довгі неупорядковані ділянки і два впорядковані домени на кінцях. Показано, що один з цих доменів здатен взаємодіяти з фактором елонгації eEF1A та пришвидшувати обмін гуанінових нуклеотидів на цьому факторі.

У наступному підрозділі увагу зосереджено на субодиниці eEF1V γ . Застосовуючи схему експериментів і моделювання, подібну до такої, що була використана для перших двох субодиниць, авторка продемонструвала, що білок eEF1V γ містить два структуровані домени (для яких створено модель їхньої структурної організації), з'єднані довгим неупорядкованим лінкером. Спостерігається схильність eEF1V γ до олігомеризації: за низької концентрації білок існує у вигляді суміші мономерів і димерів, підвищення концентрації зсуває рівновагу в бік димерів і навіть тетрамерів.

Четвертий підрозділ присвячено аналізу реконструйованих комплексів субодиниць eEF1V з метою встановити стехіометрію цих комплексів. За допомогою методів електрофорезу в нативних умовах і ультрацентрифугування показано, що комплекс eEF1V $\alpha\gamma$ існує у вигляді дигетеродимеру, що може дисоціювати на два гетеродимери при зниженні концентрації. Взаємодія між субодиницями β і γ дає два типи комплексів – три- і гексагетеродимери. Аналогічно, об'єднання всіх трьох субодиниць

приводить до утворення тримерних і гексамерних комплексів складу $(\alpha\beta\gamma)_3$ і $(\alpha\beta\gamma)_6$ відповідно.

В останньому підрозділі Розділу 3 представлено результати експериментів по воднево-дейтерієвому обміну з наступним мас-спектрометричним аналізом, на основі яких вдалось ідентифікувати сайти зв'язування для субодиниць α , β і γ у складі комплексу eEF1B. Дані про сайти зв'язування, разом з даними, отриманими у попередніх підрозділах, а також здійснений авторкою молекулярний докінг, були використані для побудови моделі структурної організації eEF1B у вигляді комплексу у складі $(\alpha\beta\gamma)_3$ – ця модель є чудовим фінальним акордом всієї роботи. У складі комплексу присутні 6 так званих GEF-доменів, кожен з яких може взаємодіяти з фактором елонгації eEF1A, що підтверджено за допомогою електрофорезу в нативних умовах.

У Розділі 4, який присвячено аналізу отриманих результатів, авторка, обговорюючи їх у загальному контексті даних інших дослідників, пропонує пояснення встановлених закономірностей та обговорює перспективи подальших досліджень. У цьому розділі представлено також гіпотетичну модель структурної організації комплексу eEF1B з шістьма молекулами елонгаційного фактору eEF1A. Не можна не погодитись із висновком авторки про те, що отримані нею результати можуть слугувати основою подальших досліджень процесів білкового синтезу не тільки в нормальних клітинах, а й у клітинах з патологічними змінами.

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи Тетяни Бондарчук полягає в тому, що в ній, за допомогою широкого набору сучасних експериментальних методів у поєднанні з методами молекулярного моделювання, отримано нові вагомні результати щодо структури еукаріотичного мультисубодиничного фактору елонгації трансляції eEF1B: створено і проаналізовано модель структурної організації, охарактеризовані структури і функціональні властивості окремих субодиниць, а також взаємодії між ними. Представлені у роботі дані

збагачують знання щодо молекулярних механізмів білкового синтезу і відкривають шлях для подальших досліджень патологічних процесів, пов'язаних з дефектами системи трансляції. 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 і регуляції клітинних процесів.

Використання сучасних експериментальних методів, ретельне виконання експериментів, застосування експериментальних підходів, що доповнюють один одного, вдале поєднання експериментальних і теоретичних підходів, узгодження отриманих результатів з існуючими експериментальними даними і висновками інших авторів, а також надійна попередня апробація отриманих результатів на сторінках авторитетних фахових наукових журналів, дозволяють констатувати **достовірність експериментальних результатів та обґрунтованість наукових висновків.**

Загалом, дисертація демонструє надзвичайно високий рівень кваліфікації автора – володіння сучасними методами, здатності аналізувати свої результати та узагальнювати їх. Разом з тим, до дисертаційної роботи Тетяни Бондарчук виникли наступні **зауваження та запитання.**

1. У розділі "Матеріали та методи досліджень" наведено рівняння, що використовувалось для аналізу результатів по кінетиці обміну гуанінових нуклеотидів, в якому фігурує параметр y_0 (горизонтальна асимптота при $x \rightarrow \infty$). Це рівняння є рішенням стандартного диференційного рівняння мономолекулярної кінетики, яке передбачає тільки одну граничну умову і отже одну константу інтегрування (амплітуду A_1). Дивлячись на наведені у роботі кінетичні криві, складається враження, що константи швидкості можна було визначити, прийнявши $y_0 = 0$, а отже виникає питання, наскільки цей параметр, фізичний сенс якого не зовсім зрозумілий, був необхідним?

2. У моделі просторової структури α -субодиниці виглядає сумнівною поодиноким α -спіраль (у негативно зарядженій області CAR): існування α -спіралі, не залученої до взаємодій з іншими сегментами регулярної вторинної структури, не тільки не сумісно з загальними міркуваннями, але й не узгоджується з проаналізованими у роботі властивостями амінокислотної послідовності цієї області та отриманими даними по воднево-дейтерієвому обміну. Цілком аналогічно, викликає сумнів окрема α -спіраль у складі β -субодиниці поряд із доменом GEF.

3. Наприкінці підрозділу 3.2.2 зроблено висновок про "динамічну третинну організацію" N-кінцевого домену субодиниці β . Цей висновок, на думку авторки, базується на експериментальних даних і результатах моделювання. Насправді, про динамічність структури свідчать тільки дані воднево-дейтерієвого обміну. Високий вміст α -спіралей, який тільки трохи знижується при підвищенні температури (за даними КД), і відсутність зв'язування ANS, вказують скоріше на достатньо стабільну глобулярну структуру цього домену.

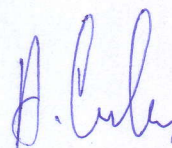
4. При дослідженні процесів олігомеризації за допомогою рівноважного ультрацентрифугування в ряді експериментів визначались константи дисоціації олігомерів. У деяких випадках константа дисоціації знижується при зниженні загальної концентрації білків. Авторка зазначає, що визначені константи є "спостережними", і це цілком зрозуміло. Але залишається незрозумілим, як спостережна константа дисоціації (обернена величина якої характеризує схильність до утворення олігомерів) може знижуватись (тобто схильність до олігомеризації зростати) при зниженні концентрації.

Наведені зауваження не носять принципового характеру і жодним чином не впливають на загальну *надзвичайно високу* оцінку розглянутої роботи.

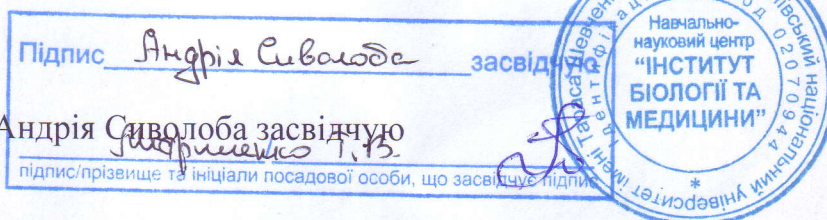
Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна

робота 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 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



Андрій СИВОЛОБ



Підпис проф. Андрія Сиволюба засвідчую

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