

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу **ШАЛАКА В'ячеслава Федоровича**

«Структурно-функціональна організація макромолекулярних комплексів і їх компонентів апарату елонгації трансляції у ссавців»,

представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Актуальність теми дисертації. Протеїни в організмі людини та тварин виконують численні життєво необхідні функції: структурні, ензиматичні, регуляторні, імунотекторні, тощо. Саме тому, за фізіологічних умов механізми трансляції на всіх етапах синтезу протеїнів повинні бути скоординованими відповідно до генетичного коду. Однак за різних патологічних станів, особливо при онкологічних захворюваннях, синтез протеїнів може зазнавати змін навіть на дорибосомному етапі. Механізми, що лежать в основі цих змін, залишаються недостатньо з'ясованими, що потребує використання нових, науково-обґрунтованих підходів, що є об'єктом представленої роботи та активних наукових досліджень молекулярних механізмів трансляції у всьому світі. Біосинтез протеїнів в еукаріотичних клітинах є складним процесом, який є просторово та структурно компартменталізованим. Характерною особливістю вищих еукаріотів є наявність двох стабільних трансляційних мультипротеїнових комплексів, які містять аміноацил-тРНК синтетази та фактори елонгації трансляції. Існують дані, що є два високогомологічних варіанти факторів елонгації трансляції eEF1A1 і eEF1A2, які кодуються різними генами, їх експресія є тканиноспецифічною, але в процесі ембріонального розвитку організму змінюється. Відомо також, що протеїни-паралоги eEF1A залучаються до інших “нетрансляційних” процесів, а саме: перебудови цитоскелету, апоптозу, аутофагії, клітинного циклу, тощо, а також можуть бути пов'язаними з розвитком патологічних станів організму. Чітке розуміння участі eEF1A1 і eEF1A2 у синтезі протеїнів потребувало проведення досліджень їхніх структурних та функціональних особливостей, а також інших потенційних механізмів їхньої дії, що наразі остаточно не з'ясовано. Відомо також, що протеїни p43, p38 і p18, які є компонентами макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз у вищих еукаріотів, хоча й не беруть безпосередньої участі в аміноацилюванні, виконують структурну роль у стабілізації комплексу та діють як регулятори, що пов'язують механізми трансляції з сигналюванням клітини, стресовими реакціями та такими захворюваннями, як рак, запалення та нейродегенерація.

Однак, молекулярні механізми, що лежать в основі вивільнення біологічно активних протеїнів (або їх фрагментів) з макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК-синтетаз все ще залишаються недостатньо дослідженими. З'ясування цих механізмів є надзвичайно важливою, як у теоретичному так і в практичному значенні проблемою сучасної молекулярної біології, біохімії та медицини. Дисертаційна робота В'ячеслава Федоровича Шалака присвячена дослідженню особливостей структурної організації і функціональної активності макромолекулярних комплексів аміноацил-тРНК синтетаз, факторів елонгації трансляції eEF1B та eEF1H, їх окремих компонентів, а також протеїну p43, компоненту макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз. На мою думку, актуальність теми дисертаційної роботи не викликає сумнівів.

Зв'язок дисертаційної роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у відділі структурної і функціональної протеоміки (раніше лабораторія білкового синтезу) Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та є фрагментом планових науково-дослідних тем відділу та держбюджетних тем: «Роль неканонічних взаємодій компонентів трансляційного апарату в організації білкового синтезу у вищих еукаріотів» (2.2.4.9; №0101U009211, 2002–2005 рр), «Особливості функціонування та множинність форм фактора елонгації трансляції 1 вищих еукаріотів» (2.2.4.9, №0105U005340, 2006–2010 рр.), «Дослідження трансляційних наноконкомплексів та їх компонентів» (2.2.4.9; №0110U000693, 2011–2015 рр), «Дослідження факторів елонгації трансляції ссавців у біосинтезі білка та інших клітинних процесах» (2.2.4.9, №0115U003744, 2016 - 2020 рр) та «Структурні та функціональні дослідження факторів елонгації трансляції вищих еукаріотів» (2.2.4.9; №0120U102238, 2021-2025 рр). Дисертант був співвиконавцем вищенаведених тем, а результати досліджень представлені у публікаціях та дисертаційній роботі.

Загальні відомості про дисертаційну роботу. Дисертаційна робота є кваліфікованою науковою працею на правах рукопису, підготовлена за сукупністю опублікованих наукових статей, які віднесені до першого і другого кuartилів (Q1 і Q2)) та об'єднані загальною тематикою стосовно структурно-функціональної організації компонентів апарату трансляції у ссавців. Дисертаційна робота В.Ф. Шалака за обсягом становить 169 сторінок і включає анотацію, вступ, три розділи, які мають 12 підрозділів, в яких викладені та проаналізовані отримані результати, висновки, один додаток, який включає список публікацій за темою дисертації. Репринт оригінальної статті здобувача англійською мовою є у всіх підрозділах основної частини. У

кожній опублікованій статті представлені результати, які ґрунтовно проаналізовано та схвалено рецензентами цих статей. Вступ до дисертаційної роботи написано лаконічно із залученням посилань на узагальнюючі літературні джерела згідно теми. Варто зазначити, що у статтях акцентована увага та запропоновані експериментальні підходи щодо можливості використання отриманих результатів у практиці, особливо у медицині, що описано та обговорено. Очевидним є той факт, що автором опрацьовано значний об'єм літературних джерел стосовно досліджуваної проблеми, доказом чого є посилання у статтях на проаналізовані літературні джерела. Автор особисто приймав участь в отриманні основної частини представлених у дисертаційній роботі результатів, їх аналізу, науковій інтерпретації, узагальненні, статистичній обробці результатів та підготовці до публікації статей. Дисертаційна робота є незалежним дослідженням автора та не містить ознак фальсифікації, плагіату чи незаконного привласнення. Усі використані матеріали та ідеї інших авторів належним чином цитовані, що забезпечує повну відповідність принципам академічної доброчесності.

Отримані здобувачем результати у повному обсязі викладені у трьох основних розділах, які стосуються досліджень обміну нуклеотидів у факторах трансляції та механізму подовження поліпептидного ланцюга рибосоною згідно структурної організації eEF1A; структурної організації і функціональної активності макромолекулярного комплексу eEF1B ($\alpha\beta\gamma$) обміну гуанін-нуклеотидів для eEF1A, фактора елонгації, який доставляє аміноацил-тРНК до рибосоми; з'ясуванню впливу некаталітичного N-кінцевого домену на активність нуклеотидного обміну елонгації трансляції фактор 1Ba та здатність цього домену зв'язувати фактор елонгації трансляції людини 1B β , а також особливостей функцій компоненту макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз, багатофункціонального протеїну p43. Всі три розділи, в яких вперше представлені нові та перспективні результати, адекватно відповідають темі та меті роботи, а також роблять виправданим розгляд поставлених завдань та є свідченням завершеності виконання надзвичайно високого наукового рівня дисертаційної роботи.

Наукова новизна, достовірність отриманих результатів і обґрунтованість висновків. У дисертації вперше встановлено, що у розчині фактор елонгації трансляції eEF1A1 у ГДФ-зв'язаній формі існує переважно у компактній конформації та відрізняється від його протеїна-паралога eEF1A2, у якого було встановлено кристалічну структуру і з'ясовано особливості механізму обміну ГДФ/ГТФ, що відрізняє фактор в еукаріотів від його бактеріального аналогу. Вперше виявлено, що eEF1A1 у ГДФ-зв'язаній

формі може не тільки утворювати неканонічний потрійний комплекс з деацильованою тРНК і четвертинний комплекс з фенілаланіл-тРНК синтетазою, але також посилює початкову швидкість реакції впливаючи на ензиматичну активність метіоніл-тРНК синтетази. Вперше встановлена структурна організація факторів елонгації eEF1B α , eEF1B β і eEF1B γ , які утворюють макромолекулярний комплекс eEF1B ($\alpha\beta\gamma$)₃, який здатен зв'язувати до шести молекул eEF1A, а також з'ясовано механізм обміну ГДФ/ГТФ на eEF1A при його зв'язуванні з eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃. Ідентифіковані сайти взаємодії субодиниць eEF1B α і eEF1B γ та eEF1B β і eEF1B γ , і встановлено, що структурний мотив «лейцинової застібки» eEF1B β відповідає за тримеризацію цього протеїну та всього комплексу eEF1B. Виявлено, що протеїн p43 здатен зв'язуватись з тРНК, але при взаємодії з аргініл-тРНК-синтетазою не впливає на її активність. Проведені дослідження дозволили виявити, що деградація протеїну p43 при індукції апоптозу супроводжується вивільненням двох фрагментів, які мають цитокін-подібні активності, при цьому вперше виявлений фрагмент p43(ARF). Вперше ідентифіковано новий трансляційний продукт гена, який кодує протеїн p43, особливістю ізоформи протеїну p43 є його мітохондріальна локалізація.

Слід зазначити, що саме завдяки використаній у роботі цілій низці сучасних методів молекулярної біології та біохімії дало змогу автору провести надзвичайно масштабні дослідження та отримати нові, перспективні результати, які доповнюють існуючі уявлення щодо молекулярних механізмів трансляції в еукаріотів у ссавців. Наукова новизна отриманих результатів підтверджена експериментально як їх кількістю, так і якістю, що відображено у наукових виданнях високої класифікації кuartилів Q1 і Q2 (12 статей) та матеріалах міжнародних конгресів, конференцій та з'їздів (18 тез). Отримані результати проведених досліджень статистично опрацьовані та достовірні, свідченням чого є представлені для захисту публікації. Грунтуючись на отриманих результатах, були сформульовані узагальнюючі висновки, які є обґрунтованими і повністю узгоджуються з отриманими результатами та вирішеними завданнями досліджень.

Практичне значення дисертаційної роботи. Отримані результати дисертаційної роботи не тільки розширюють розуміння щодо функціонування апарату трансляції вищих еукаріот, але також мають практичне значення, оскільки вони сприятимуть розробці селективних інгібіторів, з метою пригнічення негативних наслідків онкопатологій викликаних різними чинниками та активації протипухлинних механізмів організму. У роботі продемонстровано, що протеїн eEF1A1 підтримує розмноження РНК-вірусів, а eEF1A2 вважається протоонкогеном; протеїни

eEF1A1 і eEF1B β взаємодіють з трансляційно-контрольованим протеїном пухлин (TCTP), тобто ці протеїни можуть бути терапевтичними мішенями при канцерогенезі. Більше того, цитокін-подібні продукти деградації протеїну p43 комплексу аміноацил-тРНК синтетаз здатні запобігати розвитку та пригнічувати запальні процеси в організмі. З практичної точки зору, отримані результати можуть бути перспективними у розробці нових стратегій пригнічення росту злоякісних пухлин. Важливим аспектом дисертаційної роботи є включення нових результатів в якості сучасного навчального матеріалу для використання в лекціях для студентів та аспірантів різних біологічних спеціальностей, які вивчають молекулярну біологію з акцентом на функції аміноацил-тРНК синтетаз, структуру рибосом, регуляцію експресії генів.

Оприлюднення результатів дисертаційної роботи та повнота їх викладення в авторефераті. Автореферат В.Ф. Шалака чітко структуровано і викладено на 45 сторінках друкованого тексту, він включає 27 рисунків та за змістом повністю відповідає суті дисертаційної роботи та відображає основні її наукові положення і висновки. Отримані результати дисертаційної роботи, а також їх узагальнення у повній мірі представлені у 12 статтях, які опубліковані у фахових наукових журналах першого і другого кварталів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports, зокрема (Nucleic Acids Research і PNAS) та 18 тезах доповідей, які були представлені та обговорені на авторитетних міжнародних наукових форумах. Публікації автора мають надзвичайно високе визнання серед наукової спільноти, оскільки згідно наукометричної бази Scopus мають 835 цитувань та h-індекс – 15.

Зауваження та запитання до дисертаційної роботи

Слід зазначити, що принципових зауважень до дисертаційної роботи не виявлено. Разом з тим при ознайомленні з дисертаційною роботою в плані дискусії виникло декілька запитань та одне зауваження.

1. Як конформаційні відмінності між протеїнами паралогами eEF1A1 і eEF1A2 впливатимуть на їхню ефективність трансляції, особливо під час етапу елонгації, і чи можуть їхні структурні відмінності сприяти тканинно-специфічній експресії та функціям?

2. Які фізіологічні функції виконують неканонічні комплекси eEF1A1 з деацильованою тРНК, PheRS та MetRS у регуляції ефективності трансляції або аміноацилювання? Чи можуть такі взаємодії відбуватися *in vivo* за несприятливих умов, таких як оксидативно-нітрозативний стрес або стрес ендоплазматичного ретикулуму, і чи можуть ці комплекси діяти як

регуляторні центри, що пов'язують елонгацію з активністю аміноацил-тРНК синтетази?

3. У більшості наукових досліджень використовуються органи та тканини мишей та щурів різних ліній. Яке було обґрунтування використання екстрактів печінки та м'язової тканини кроликів у цьому дослідженні, і як цей вибір пов'язаний з досліджуваними факторами елонгації трансляції?

4. На мою думку, як в авторефераті, так і в дисертаційній роботі слід було чіткіше підкреслити практичне значення отриманих результатів, зокрема: якщо йдеться про використання селективних інгібіторів, з метою пригнічення негативних наслідків онкопатологій, хоча б висунути гіпотезу про те, які класи хімічних сполук, в ідеалі нетоксичні для організму, можуть бути селективними інгібіторами протоонкогенних факторів, і чи можуть їхні механізми дії відрізнитися залежно від типу онкологічного захворювання та ураженого органу?

5. На с.4, с.43 та с. 44 автореферату та с.25 та с.9 дисертації відповідно, автором допущена помилка щодо значення слова кофактор (cofactor): (автореферат) «Показано, що p43 не впливає на каталітичні параметри аргініл-тРНК синтетази...Отже, білок p43 не є кофактором для цього ферменту» та “We have shown that p43 does not affect the catalytic parameters of arginyl-tRNA synthetase....Thus, the p43 protein is not a cofactor for this enzyme”, оскільки протеїн p43 не може бути кофактором ні цього, ні жодного іншого ензиму.

Однак, наведені запитання і одне зауваження жодним чином не впливають на загальну **незмірно високу оцінку** розглянутої дисертаційної роботи.

Висновок. Вважаю, що дисертаційна робота Шалака В'ячеслава Федоровича «Структурно-функціональна організація макромолекулярних комплексів і їх компонентів апарату елонгації трансляції у ссавців» є завершеним науковим дослідженням, яке розкриває раніше невідомі молекулярні механізми особливостей структурної організації і функціонування дорибосомного етапу елонгації трансляції у ссавців, що є ваговим внеском для молекулярної біології. Дисертаційна робота за актуальністю, науковою новизною, вирішенням поставлених завдань на високому методичному рівні, обсягом отриманих результатів, їх теоретичним і практичним значенням виконана з дотриманням принципів академічної доброчесності. Дисертаційна робота повністю відповідає вимогам передбаченим пунктами 7 та 9 «Порядку присудження та позбавлення

наукового ступеня доктора наук» (Постанова Кабінету Міністрів України № 1197 від 17.02.2021, зі змінами, внесеними згідно Постанов Кабінету Міністрів України № 502 від 19.05.2023 і № 507 від 03.05.2024), наказом МОН України № 40 від 12.01.2017 «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій, наказом МОН України № 1220 від 23.09.2019», «Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук» (зі змінами згідно наказів МОН України № 496 від 27.05.2022 і № 285 від 08.03.2024). Автор дисертаційної роботи, Шалак В'ячеслав Федорович, безперечно заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент
провідний науковий співробітник
відділу біохімії вітамінів і коензимів
Інституту біохімії
ім. О. В. Палладіна НАН України
доктор біологічних наук, професор

Тамара КУЧМЕРОВСЬКА

“15” вересня 2025 р.

