

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. На сьогоднішній день встановлення особливостей функціонування апарату трансляції вищих еукаріотів залишається у фокусі уваги провідних наукових центрів у світі. Це стосується як структурного дослідження самої рибосоми, так і дорибосомного етапу білкового синтезу де функціонують аміноацил-тРНК синтетази і фактори елонгації трансляції. Відомо, що в клітинах вищих еукаріотів половина аміноацил-тРНК синтетаз, а також деякі фактори елонгації трансляції утворюють стабільні мультибілкові комплекси, структура яких на сьогоднішній день є достеменно невідомою. Найбільший з цих комплексів має у своєму складі дев'ять аміноацил-тРНК синтетаз і три додаткових білка, названих р43, р38 і р18. До іншого стабільного комплексу входять валіл-тРНК синтетаза (VRS) і фактори елонгації трансляції α , β і γ групи eEF1B. eEF1B і VRS-eEF1B можуть утворювати лабільні комплекси з фактором eEF1A – ключовим G-білком циклу елонгації трансляції. Існує два високогомологічних (97%) варіанти цього білка eEF1A1 і eEF1A2, які кодуються різними генами. eEF1A2 синтезується в нейронах, міоцитах і кардіоміоцитах, тоді як eEF1A1 – у всіх інших клітинах. Є дані, що eEF1A2 може виступати в ролі онкогену при розвитку раку яєчника і легенів. Отже, ґрунтовні дослідження відмінностей структурної організації eEF1A1 і eEF1A2 є необхідними як для чіткого розуміння їх ролі в процесі білкового синтезу, так і для аналізу потенційних механізмів виконання ними численних неканонічних функцій.

Білки макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз р43, р38 і р18, окрім структурної ролі, можуть виконувати додаткові неканонічні функції. Зокрема, білок р43 може бути попередником прозапального цитокіну ЕМАРІІ. Однак, молекулярні механізми вивільнення біологічно активних білків (або фрагментів білків) з макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз залишаються нез'ясованими. Очевидно, що розуміння цих механізмів є важливим як з точки зору фундаментальної науки, так і прикладної біомедичної галузі.

Беручи до уваги вищезазначене, актуальність дисертаційної роботи В'ячеслава Шалака не викликає сумніву як з теоретичної так і практичної точок зору.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота Шалака В. Ф. виконувалась з 2002 по 2022 роки в рамках наукової тематики відділу структурної та функціональної протеоміки (раніше лабораторія білкового синтезу) Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Загальні відомості про роботу. Обсяг дисертаційної роботи становить 169 сторінок. До її складу входять: анотація, вступ і основна частина, розділена на три розділи, які разом містять 12 наукових статей, де в повному обсязі викладено і обговорено отримані експериментальні результати. За основною частиною йдуть висновки і один додаток з переліком опублікованих праць дисертанта. В кожному розділі основної частини роботи наведено відбитки наукових статей автора англійською мовою. Перший розділ присвячено вивченню особливостей структурної організації факторів елонгації трансляції ссавців eEF1A1 та eEF1A2 і неканонічним взаємодіям eEF1A1. У другому розділі обговорюється структурна організація комплексу факторів елонгації трансляції eEF1B людини. У третьому розділі висвітлено подвійну роль білка р43. З одного боку як тРНК-зв'язувального білка макромолекулярного комплексу

аміноацил-тРНК синтетаз і, з іншого боку, як прекурсора цитокін-подібних білків. Також описано мітохондріальну локалізацію довгої ізоформи білка р43.

У дисертаційній роботі викладено результати самостійних досліджень здобувача, ознак фальсифікації, компіляції чи запозичень не виявлено. Усі матеріали інших авторів згадані як в дисертації, так і в авторефераті мають належні посилання на відповідні джерела. Це дозволяє зробити висновок про дотримання автором принципів академічної доброчесності при підготовці рукопису.

Наукова новизна, достовірність отриманих результатів і обґрунтованість висновків. В дисертаційній роботі наведено ряд нових результатів, які деталізують наше розуміння молекулярних механізмів трансляції в еукаріотичній клітині.

Вперше встановлено, що фактор елонгації трансляції eEF1A1 в ГДФ-зв'язаній формі має видовжену конформацію в розчині, може утворювати неканонічний потрійний комплекс з деацильованою тРНК і четвертинний комплекс з фенілаланіл-тРНК синтетазою, а також збільшує початкову швидкість реакції, яку каталізує метіоніл-тРНК синтетаза. Вперше виявлено взаємодію трансляційно-контрольованого білка пухлин (ТСТР) з факторами елонгації трансляції eEF1A1 і субодиницею eEF1B β , що призводить до зниження швидкості реакції як спонтанного обміну, так і eEF1B β -опосередкованого обміну гуанінового нуклеотиду на молекулі eEF1A1. Вперше розшифровано кристалічну структуру фактора елонгації трансляції eEF1A2 і встановлено, що іони Mg²⁺ не впливають на реакцію обміну гуанінового нуклеотиду на цьому факторі.

Вперше детально досліджено структурну організацію факторів елонгації eEF1B α , eEF1B β і eEF1B γ , які утворюють макромолекулярний комплекс eEF1B і побудовано його структурну модель у вигляді три-

гетеротримеру типу $(\alpha\beta\gamma)_3$. Розкрито механізм стимуляції активності eEF1Ba субодиницею eEF1B γ при утворенні комплексу між ними.

У роботі вперше детально досліджено подвійну роль білка p43, який входить до мультисинтетазного комплексу вищих еукаріотів. Не зважаючи на те, що p43 взаємодіє з аргініл-тРНК синтетазою, він не впливає на її каталітичні властивості і не збільшує її спорідненість до відповідної тРНК. Отже, білок p43 не є кофактором для цього ферменту. Інкубація комплексу аміноацил-тРНК синтетаз з каспазою 7 *in vitro* призводить до розщеплення його p43 компоненту на два фрагменти. Його С-кінцевий фрагмент, який вивільняється з комплексу, є ідентичним ЕМАРІІ і здатен викликати хемотаксис моноцитів. Розщеплення p43 призводить до втрати його тРНК-з'язувальної властивості. Індукція апоптозу в клітинах U937 призводить до появи і вивільнення з клітин іншого протеолітичного фрагменту білка p43, названого p43(ARF), який на 40 амінокислот довший ніж ЕМАРІІ. Показано, що, на відміну від повнорозмірного p43, p43(ARF) і ЕМАРІІ не індукують експресію Е-селектину в ендотеліальних клітинах (HUVeC). Вперше ідентифіковано новий трансляційний продукт гена, який кодує білок p43. Цей продукт має мітохондріальну локалізацію і є на 9 амінокислот довшим, ніж цитоплазматична ізоформа p43.

Насамперед, достовірність отриманих результатів була забезпечена широким спектром сучасних методів молекулярної біології, біохімії, біофізики, а також клітинної біології застосованих при виконанні роботи. Важливо відзначити також, що результати були оприлюднені на сторінках наукових видань з серйозною науковою репутацією, а, значить, пройшли експертне рецензування кваліфікованими науковцями. Отже, достовірність отриманих результатів так як і обґрунтованість зроблених висновків не викликають сумнівів.

Практичне значення дисертаційної роботи. Результати представлені в дисертаційній роботі не тільки збагачують наші теоретичні уявлення про функціонування апарату трансляції вищих еукаріот, але і

мають певне практичне значення. Так як фактор елонгації трансляції eEF1A2, який вважається прото-онкогенним білком, а eEF1A1 є важливим компонентом системи розмноження РНК-вірусів. Обидва білка потенційно можуть бути використаними в якості мішеней для розробки специфічних інгібіторів. Окрім цього, існування взаємодії eEF1A1 і eEF1B β з трансляційно-контрольованим білком пухлин (TCTP) також пов'язує фактори елонгації трансляції з процесом злоякісної трансформації клітини. Така взаємодія може бути ще однією мішенню для розробки лікарських засобів нового покоління. Цікавим є також практичний потенціал протеолітичних фрагментів білка p43, які можуть грати роль певних сигналів, що забезпечують ефективне видалення апоптозних клітин імунною системою, уникаючи розвитку запального процесу. Отже, використання цих фрагментів потенційно може бути перспективним в якості додаткового засобу, наприклад, локального застосування для зменшення запального процесу в організмі.

Оприлюднення результатів дисертаційної роботи та повнота їх викладення в авторефераті. Наукові надбання дисертанта викладено загалом в 30 публікаціях, серед яких 12 статей у фахових наукових журналах, які відносяться до першого (Q1) чи другого (Q2) кuartилів, відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports. Серед найбільш рейтингових видань є *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *Nucleic Acids Research*, *Journal of Biological Chemistry*, *Biochemistry*. Факт публікації у високо-рейтингових журналах свідчить на користь високої якості експериментальних робіт. Можна стверджувати, що опубліковані статті і тези наукових конференцій є вірною запорукою проведення всебічної апробації дисертаційної роботи у міжнародному науковому середовищі. Відповідно до науко-метричної бази Scopus наукові роботи, які увійшли до

складу дисертаційної роботи, на цей час налічують більше 800 цитувань, що також є певним індикатором їх якості і актуальності.

Автореферат в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи. В основній частині достатньо детально описано методи дослідження і представлено результати дослідження і їх обговорення трьома окремими розділами, відповідно до тих, які присутні в дисертаційній роботі. Загалом, 27 комбінованих рисунків і одна таблиця відображають найбільш вагомні експериментальні результати представлені в дисертації.

Зауваження та запитання до дисертаційної роботи. Під час рецензування дисертаційної роботи Шалака В.Ф. принципних зауважень, які б стосувались суті і оформлення результатів роботи не виникло, але є кілька запитань загально-практичного плану.

1. Чи може автор припустити яким чином іони Mg^{2+} взаємодіють з фактором елонгації eEF1A1?
2. Яка природна концентрація трансляційно-контрольованого білка пухлин (TSTR) в клітині і в якому концентраційному співвідношенні він знаходиться з факторами елонгації трансляції?
3. Чи викликали індукцію апоптозу в клітинах U937 іншим способом (агентами)? Якщо так, то чи спостерігалось протеолітичне розщеплення білка p43 за цих умов?
4. Яким шляхом на думку автора може відбуватися вивільнення p43(ARF) з апоптотичних клітин? Чи може це бути шлях секреції чи тільки пасивної дифузії?

Очевидно, що наведені запитання не піддають сумніву високу цінність дисертаційної роботи, але лише мають на меті отримання додаткової інформації.

Висновок. Вважаю, що дисертаційна робота Шалака В'ячеслава Федоровича "Структурно-функціональна організація макромолекулярних

