

## ВІДЗИВ

### офіційного опонента

на дисертаційну роботу БОЯРШИНА Костянтина Сергійовича  
"Структурно-функціональні основи редагуючої активності проліл-тРНК  
синтетази з *Enterococcus faecalis*", представлену до захисту на здобуття  
наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 –  
молекулярна біологія

Вивчення молекулярних механізмів, що забезпечують точність білкового синтезу, є важливим напрямком сучасної молекулярної біології, який має велике значення для розуміння закономірностей функціонування біологічних систем. Ключова роль у таких механізмах належить аміноацил-тРНК-синтезам (АРС), які здатні редагувати власні помилки як після активації амінокислот, так і після аміноацилювання тРНК. Дисертаційна робота К. С. Бояршина присвячена дослідженню механізмів редагування помилкової аланіл-тРНК<sup>Pro</sup> проліл-тРНК-синтезазою (ПроРС) з *Enterococcus faecalis*. Оскільки питання про тонкі молекулярні механізми редагування помилок аміноацил-тРНК-синтезазами залишаються недостатньо з'ясованими, тему дисертаційної роботи слід безперечно визнати **актуальною**.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Дисертація, що побудована за загальноприйнятою схемою, містить 142 сторінки основного тексту, ілюстрована 36 рисунками і 5 таблицями, список використаних джерел містить 134 посилання, серед яких добре представлено роботи останніх років. Дисертація добре оформлена.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 18 публікацій, в тому числі 5 статей у фахових наукових журналах. При цьому всі статті надруковано в журналах, що входять до наукометричної бази даних Scopus (серед них одна публікація в журналі з імпаکت-фактором на рівні 2). Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо структури і механізмів роботи аміноацил-тРНК-синтез, а також методів дослідження їх

редагуючої активності, є стислим, але надзвичайно змістовним – таким, що демонструє високий рівень теоретичної підготовки автора.

У роботі використано широкий набір сучасних методів молекулярної біології, описаних у Розділі 2: клонування фрагментів ДНК, сайт-спрямований мутагенез, модифікація тРНК, синтез РНК *in vitro*, проведення ферментативних реакцій з метою вивчення функціональних активностей ПроРС та інші. Висока якість проведених експериментів не викликає сумніву. Особливістю роботи є співставлення отриманих експериментальних результатів із результатами моделювання молекулярної динаміки і квантово-хімічних розрахунків, що дозволило автору здійснити глибокий теоретичний аналіз проблеми, що вивчалась.

Робота К. С. Бояршина мала на меті дослідити механізми пре- і посттрансферного редагування ПроРС. Отримані результати представлені у чотирьох підрозділах розділу 3.

Для вирішення поставлених завдань автору було необхідно провести велику підготовчу роботу: клонувати гени тРНК кількох типів і здійснити синтез відповідних тРНК *in vitro* за допомогою РНК-полімерази Т7, виділити і очистити ці тРНК, охарактеризувати їхні властивості як субстратів для ПроРС. Опису цього кола питань присвячено перший підрозділ. Слід зауважити, що розроблені автором методики мають значення і самі по собі – можуть бути використані у подальших дослідженнях процесів білкового синтезу.

У другому підрозділі представлено результати дослідження ролі тРНК у претрансферному редагуванні ПроРС. Автором представлено докази того, що, по-перше, така роль має місце – для АРС другого класу це продемонстровано вперше. По-друге, за допомогою внесення модифікацій по ОН-групам рибози 3'-кінцевого нуклеотиду, автор переконливо продемонстрував, що претрансферне редагування є каталітичним процесом, опосередкованим 3'- і 2'-ОН групами рибози.

Третій підрозділ присвячено дослідженню редагуючого активного центру ПроРС методом спрямованого мутагенезу. Проаналізувавши структуру



ферменту і дані інших дослідників, автор визначив потенційно важливі для редагування амінокислотні залишки, створив і отримав 11 мутантних форм ферменту і проаналізував їхню функціональну активність. У результаті було виявлено одну амінокислотну заміну, від якої суттєво залежить ефективність посттрансферного редагування, ще кілька замін, що мають деякий вплив, а також заміну, яка зумовлює здатність ПроРС деацилювати проліл-тРНК<sup>Pro</sup>. Отримані результати сприяють кращому розумінню механізмів редагування.

У четвертому підрозділі представлено найбільш цікаві результати – по вивченню ролі тРНК у посттрансферному редагуванні. Використовуючи модифіковані по ОН-групам рибози кінцевого нуклеотиду тРНК, автор продемонстрував, що 2'-ОН група відіграє ключову роль у каталізі деацилювання помилкової аміноацил-тРНК.

У Розділі 4, який присвячено аналізу отриманих результатів, автор, обговорюючи їх у загальному контексті даних інших дослідників, пропонує пояснення встановлених ним закономірностей. Важливою частиною цього розділу є детальне обговорення результатів, отриманих в ході моделювання молекулярної динаміки і квантово-хімічних розрахунків, проведених іншими дослідниками за участі автора роботи. Теоретичні дослідження узгоджуються з отриманими у дисертаційній роботі експериментальними даними: вони передбачають залежний від субстрату механізм каталізу реакції деаміноацилювання за участі 2'-гідроксильної групи рибози 3'-кінцевого нуклеотиду.

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи К. С. Бояршина полягає в тому, що в ній отримані нові результати щодо механізмів редагування помилок аміноацилювання тРНК аміноацил-тРНК-синтетазами. Представлені у роботі дані поглиблюють уявлення про молекулярні механізми білкового синтезу. 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 закономірностей трансляції.

Використання сучасних експериментальних методів, застосування експериментальних підходів, що доповнюють один одного, ретельне виконання експериментів, узгодження отриманих результатів з існуючими експериментальними даними і висновками інших авторів дозволяють констатувати **достовірність експериментальних результатів та обґрунтованість наукових висновків.**

Загалом, дисертація демонструє високий рівень кваліфікації автора – володіння сучасними методами, здатності аналізувати свої результати та узагальнювати їх. До дисертаційної роботи К. С. Бояршина **принципових зауважень немає.** При ознайомленні з дисертацією виникло тільки декілька **запитань.**

1. Обговорюючи рис. 3.10, автор мимохідь зазначає, що накопичення аланіл-АМФ, яке практично не відбувається у присутності нативної тРНК<sup>Pro</sup>*Rp*, здійснюється як у відсутності тРНК, так і в присутності транскрипта тРНК<sup>Pro</sup>*Ef*. Чому це відбувається у присутності синтезованої *in vitro* тРНК<sup>Pro</sup>*Ef*, адже вище вказано, що вона майже не відрізняється від нативної за спорідненістю до ПроРС?

2. Дані, представлені на рис. 3.11, є не зовсім зрозумілими при порівнянні з рис. 3.10. Рис. 3.10 показує, що за відсутності тРНК спостерігається визволення аланіл-АМФ з активного центру ПроРС (що вважалось нульовим моментом часу в цьому експерименті?). Але, як демонструє рис. 3.11, за відсутності тРНК спостерігається зниження концентрації аланіл-АМФ. Що було прийнято за нульовий момент часу в цьому експерименті? І як співвідносяться ці два експерименти?

3. На початку розділу 4 автор зауважує, що питання про фізіологічне значення *in vivo* тРНК-залежного претрансферного редагування залишається відкритим. Проте, як свідчать отримані автором дані щодо константи швидкості накопичення АМФ (табл. 3.1), внесок претрансферного редагування



у загальне редагування становить близько 30%. Що змушує автора сумніватись у фізіологічному значенні цього процесу?

Наведені зауваження жодним чином не впливають на загальну *надзвичайно високу* оцінку розглянутої роботи.

**Оцінюючи роботу в цілому,** можна констатувати, що дисертація К. С. Бояршина є завершеним дослідженням в актуальній області молекулярної біології та містить ряд важливих наукових і практичних результатів.

Враховуючи актуальність та обсяг проведених досліджень, наукову новизну одержаних результатів, обґрунтованість висновків, перспективи наукового та практичного застосування, вважаю, що дисертаційна робота Бояршина Костянтина Сергійовича “Структурно-функціональні основи редагуючої активності проліл-тРНК синтетази з *Enterococcus faecalis*” повністю відповідає вимогам постанови КМ України від 24 липня 2013 року №567 “Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника”, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент,  
доктор біологічних наук, професор,  
професор кафедри загальної та молекулярної генетики  
ННЦ “Інститут біології та медицини” Київського  
національного університету імені Тараса Шевченка

А. В. Сиволоб

Підпис проф. А. В. Сиволоба засвідчую

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

