

ВІДЗИВ
офіційного опонента
на дисертаційну роботу
Савицького Олександра Вячеславовича
"КОМП'ЮТЕРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДИНАМІКИ
***H. sapiens* ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ ТА ЇЇ МУТАНТНИХ ФОРМ"**,
представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Дисертаційна робота Савицького О.В. присвячена реконструкції повноатомної моделі просторової структури тирозил-тРНК синтетази людини, а також, з'ясуванню фундаментальних аспектів функціонування цього ферменту у нативному і патологічному станах за допомогою методів структурної біоінформатики. Зокрема, метою роботи було комп'ютерне моделювання *H. sapiens* тирозил-тРНК синтетази та її мутантних форм і дослідити конформаційні зміни структур з використанням методу молекулярної динаміки.

Ферменті родини аміноацил-тРНК-синтетаз виконують ключову роль в процесі трансляції генетичної інформації на дорибосомному етапі біосинтезу білку. Представники родини приймають участь у сплайсингу РНК, утворюють комплекси з мРНК, регулюють біосинтез амінокислот, причетні до патогенезу аутоімунних і нейродегенеративних захворювань. Порушення у роботі аміноацил-тРНК-синтетаз також призводить до виникнення різноманітних онкологічних патологій.

Встановлення повної просторової структури тирозил-тРНК синтетази людини, а також, її конформаційної рухливості і досі залишається одним з невирішених питань молекулярної біології. Так, існують лише досить фрагментарні експериментальні данні стосовно структури тирозил-тРНК синтетази, і у свою чергу, вони представлені лише статичними моделями що були побудовані на підставі результатів x-Ray. Зараз, для тирозил-тРНК синтетази людини, в RCSB Protein Data Bank депоновано лише 7 структур, з роздільною здатністю x-Ray від 1.5 до 3.0 Å. В свою чергу, встановити найбільш динамічні елементи структури, а також експериментально дослідити повну конформаційну рухливість вищезазначеного ферменту зараз неможливо. Фактично, вирішення подібного завдання було можливе лише за допомогою методів структурної біоінформатики і колосальних за об'ємом даних і часу обчислень молекулярної динаміки. Тому, використання дисертантом сучасних технологій розподілених обчислень для вирішення поставлених задач, на мій погляд, видається цілком обґрунтованим і логічним.

Савицькому О.В. вдалося в повній мірі на практиці застосувати обчислювальний потенціал Українського національного ґриду (УНГ) і, безпосередньо, спеціалізованої

віртуальної лабораторії MolDynGrid для вирішення ряду ресурсоемних і високотехнологічних задач обчислювальної молекулярної біології. Слід зазначити безпосередній зв'язок дисертаційних досліджень добувача з більшістю розробок і науково-технічних проєктів віртуальної організації MolDynGrid, та їх безпосередній зв'язок з інтеграцією у Європейську грид-інфраструктуру (EGI).

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Робота відповідає основному плану фундаментальних досліджень, що виконувались у відділі білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, в рамках декількох бюджетних (№0107V004938; №0112U003747) та конкурсних (№01090004889; 0110U005745; №0113U005318; №0114U004667) тематик.

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів, ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Дисертаційна робота Савицького О.В. була виконана на сучасному науковому та методичному рівні і ґрунтується на значному матеріалі оригінальних досліджень і авторських розробок. Усі експерименти були виконані автором особисто або за його безпосередньою участю. Під час виконання дисертаційних досліджень, автором було сформовано критерії застосування існуючих програмних засобів і методик комп'ютерного моделювання та аналізу біологічних систем. По суті, крім наукового значення дослідження, експерименти що були виконані дисертантом, були моделлю для відпрацювання екосистеми віртуальної лабораторії MolDynGrid, її програмного, апаратного і методологічного наповнення. Так, було відпрацьовано методики отримання, зберігання і аналізу траєкторій молекулярної динаміки в водно-іонному оточенні, відпрацьовано системи автоматизації досліджень в ВО, розроблено унікальну систему інтеграції лабораторії MolDynGrid в Український національний грид (UNG) мережу та глобальну Європейську грид-інфраструктуру (EGI).

Виконаний автором унікальний аналіз молекулярної динаміки повнорозмірної *HsTyrRS* людини довів, що зв'язування С-модулів з каталітичними доменами TyrRS є асиметричним з точки зору утворення інтерфейсів міжмодульних взаємодій. Доведено що зв'язування з С-модулем призводить до раптового зниження внутрішнь-молекулярної мобільності, що водночас не впливає на зберігання рухливості другого С-модулю. Також, під час дослідження, автором, було доведено існування трьох контактних інтерфейсів на поверхні N-домену TyrRS (Tyr79-Leu89, Pro200-Tyr204; Lys335, Ser338; Ala339), до яких входить і Trp87. Встановлено, що показники вищезазначених міжмодульних контактів *HsTyrRS* корелюють із результатами попереднього крупнозернистого моделювання HIEROT.

Було доведено, утворення водневих зв'язків між залишком Arg93 цитокінового ELR-мотиву та залишками Ala340 і Glu479 С-модулю. Отримані дані підтвердили гіпотезу про те, що повнорозмірна молекула *HsTyrRS* позбавлена цитокінової активності завдяки безпосередньої взаємодії N- і С-кінцевих доменів, що призводить до екранування цитокінового ELR-мотиву у компактній структурі ферменту.

Особливої уваги заслуговують результати, отримані здобувачем для мутантних форм тирозил-тРНК синтетази людини. Вперше була досліджена молекулярна динаміка мутантних форм ферменту: G41R і del153-156VKQV. Доведено можливість динамічного формування антипаралельної β -шпильки, яка виникає в неструктурованій ділянці між спіралями H9 і H10. У свою чергу це може впливати на взаємодію з білками-партнерами, а також, на неспецифічну агрегацію мутантної *TyrRS*. Було визначено водневі зв'язки в структурі мутантної форми G41R між петлею CP1-вставки Lys147 – Glu157 та залишками каталітичної KMSSS-петлі. Визначено зменшення експонованості молекулярної поверхні активного центру у мутантної форми G41R *HsTyrRS*. У підсумку, отримані дані, дозволили автору висловити гіпотезу, що вищезазначені конфірмаційні ефекти можуть призводити як до зміни структури активного центру *HsTyrRS*. Це призводить до змін у селективності взаємодії мутантних форм з їх молекулярними партнерами, впливає на біосинтез білку, наслідком чого є розвиток синдрому нейродегенеративного розладу Шарко-Мари-Туса.

Здобувачем підтверджена можливість взаємодії іону хлору з залишком аргініну R41 в активному центрі тирозил-тРНК синтетази, що є подібним до мутанта G526R гліцил-тРНК синтетази. Це може пояснюється появою функціонально значимої позитивно зарядженої області в активних центрах обох мутантів: G41R і G526R. Моделювання молекулярної динаміки вищезазначених мутантів, визначило вихід L-тироzinу з структури активного центру мутантної G41R *HsTyrRS*, що корелює з ефектами в мутантній форми G526R *HsGlyRS* що спостерігалися під час експериментів.

Таким чином, автором було вперше проведено моделювання утворення комплексів *TyrRS* людини з низько- та високомолекулярними субстратами з урахуванням можливих структурних особливостей ферменту.

Таким чином, слід зазначити цілісність і безсумнівну обґрунтованість наукових положень, висновків і гіпотез сформульованих у дисертації. Гарне і грамотне поєднання методів *in silico* та обчислювальних можливостей MolDynGrid, що дозволило здобувачу виконати унікальні за об'ємом і достовірністю реконструкції комплексів *TyrRS* людини з низько- та високомолекулярними субстратами з врахуванням існуючих і можливих структурних особливостей тирозил-тРНК синтетази людини.

Практичне значення одержаних результатів.

В результаті виконання дисертаційної роботи автором було отримано унікальні результати стосовно структурних особливостей і функціонування тирозил-тРНК синтетази людини у нормі, а також її мутантних форм, які безпосередньо пов'язані з проявами патологій, таких як нейропатія Шарко-Мари-Туса. Розуміння первопричин виникнення цієї спадкоємної моторно-сенсорної невропатії дозволить не лише здійснювати ранню діагностику захворювання (ще до його перших проявів ~10 років), але також переглянути можливості і стратегії терапевтичного втручання.

Побудовані структурні моделі і траєкторії молекулярної динаміки було депоновано у репозиторії BO MolDinGrid, що робить їх доступними для подальшого використання у наукових дослідженнях.

Експерименти що були виконані дисертантом, є моделлю що дозволила відпрацювати екосистему віртуальної лабораторії MolDynGrid, її програмного, апаратного і методологічного наповнення. Відпрацьовані методики отримання, зберігання і аналізу траєкторій молекулярної динаміки в водно-іонному оточенні, відпрацьовано системи автоматизації досліджень в БО. Здійснено унікальну роботу з інтеграції MolDynGrid в Український національний грид (UNG) мережу та Європейську грид-інфраструктуру (EGI). По суті, був відпрацьований різноплановий і дружній до користувача інструмент, що відкриває можливості здійснення різноманітних розрахунків в галузі молекулярної біології і структурної біоінформатики.

Особистий внесок здобувача

Викладені в дисертації результати було отримано автором особисто або за його безпосередньої участі.

Повнота викладу результатів у наукових публікаціях.

Загалом, за матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових праць: 9 статей, включаючи 6 у фахових виданнях (5 зареєстровані у наукометричній базі даних “Scopus”) і 7 публікацій у матеріалах закордонних та вітчизняних наукових конференцій.

Структура дисертації

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, експериментальної частини, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 220 найменування та додатку. Дисертацію викладено на 146 сторінках стандартного машинопису, вона містить 42 рисунків та 7 таблиць.

У роботі чітко сформульовано мету і завдання дослідження. Застосовані методи дослідження відповідають сучасному світовому рівню і логічно обґрунтовані завданням

дослідження. Зроблені висновки логічні і відповідають меті і завданням дисертаційного дослідження.

Окремі дискусійні питання і зауваження до дисертації.

Опонент не має принципових зауважень до роботи. Декілька запитань для дискусії та зауважень технічного характеру наведено нижче:

1. Деякі підсумки до підрозділів рукопису схиляються до констатаційного характеру і, на мою думку, мали би бути з акцентом на те, про що це свідчить у молекулярно-біологічному сенсі. Наприклад: “Проведено молекулярне моделювання каталітичної KMSSS петлі *HsTyrRS* із закритою конформацією”; “Отримано структури *HsTyrRS* в комплексах з L-тирозином, L-тирозином та АТР, тирозил-аденілатом та PРі із врахуванням різного стану каталітичної петлі (відкрита або закрита)” (ст. 94)
2. Не зрозуміло, чому дисертантом для аналізу міжмолекулярних взаємодій між неструктурованою петлею CP1-вставки *HsTyrRS* із тРНК^{Тур} обрано саме ділянку Lys147 – Glu157. В той же час, з тексту дисертації та за літературними даними відомо, що одним із найважливіших амінокислотних залишків є His158. (ст. 104)
3. З тексту дисертаційної роботи не зовсім зрозуміло, чому молекулярне моделювання тирозил-тРНК синтетази людини в комплексі з відповідною тРНК та фактором елонгації eEF1A2 проводилось лише для каталітичних модулів (2x39 кДа), а не для повнорозмірної синтетази (2x59 кДа). (ст. 107)
4. У підрозділі 3.6.2. дисертант співставляє молекулярні механізми у порушенні взаємодії L-тироzinу з мутантними формами G41R *HsTyrRS* та G526R *HsGlyRS*. На мою думку, не вистачає порівняння структурно-функціональних особливостей цих ферментів, що відносяться до різних класів родини аміноацил-тРНК синтетаз.
5. На мій погляд, в дисертації спостерігається як би дві роботи: 1) пов'язана з науковою складовою - дослідженням тирозил-тРНК синтетази людини, і 2) пов'язана з побудовою інфраструктури віртуальної організації (лабораторії) MolDynGrid. На мій погляд обидва ці напрями насправді були дуже тісно пов'язані між собою, як "модель" і "інструмент", але їх відокремленість у рукопису не була усунена повністю.

Висновок:

Враховуючи все вищесказане, вважаю, що дисертаційна робота Савицького О.В. «Комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки *H. sapiens* тирозил-тРНК синтетази та її мутантних форм» представляє собою завершену наукову працю, присвячену важливій науковій і практичній проблемі. За структурою, актуальністю задач, теоретичним та методичним рівнем, новизною, фундаментальним та практичним значенням отриманих результатів дисертаційна робота цілком відповідає 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 рецензент,

Завідувач лабораторії біоінформатики та структурної біології,
Відділу геноміки та молекулярної біотехнології,
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки
Національної академії наук України»
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник

Карпов П.А.

Підпис зав. лабораторії біоінформатики та структурної біології,
к.б.н., с.н.с.

Карпова П.А.

ЗАСВІДЧУЮ

Вчений секретар

ДУ «Інститут харчової біотехнології
та геноміки НАН України»,
к.б.н.



Пірко Я.В.