

ВІДГУК
офіційного опонента

на дисертаційну роботу РАЄВСЬКОГО Олексія Володимировича
"Молекулярна динаміка комплексів лейцил-тРНК-синтетаз бактеріального та архейного походження із помилково синтезованими продуктами реакції аміноацилювання", представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Молекулярні механізми забезпечення точності білкового синтезу, ключовим елементом яких є редагувальні активності аміноацил-тРНК-синтетаз (АРСаз), є важливою проблемою сучасної молекулярної біології. Як і в інших розділах молекулярної біології, головну роль у вирішенні цієї проблеми відіграють експериментальні підходи. Але при цьому все більш важливими стають методи молекулярного моделювання *in silico*, які суттєво допомагають інтерпретувати експериментальні результати, визначати нові напрями досліджень, а також знаходити нові рішення, що залишились поза увагою або можливостями експериментаторів. Дисертаційна робота О. В. Раєвського присвячена моделюванню молекулярної динаміки кількох АРСаз у комплексах із помилковими продуктами їхньої активності. Оскільки питання про тонкі молекулярні механізми редагування помилок аміноацил-тРНК-синтетазами 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 147 сторінок (141 сторінка основного тексту і 2 додатки). Дисертація ілюстрована 31 рисунком і 6 таблицями, список використаних джерел містить 100 посилань. В цілому дисертація добре оформлена (деякі недоліки оформлення зазначені нижче).

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 виданнях (всі відображені у науковометричній базі Scopus). Серед них 3 статті надруковано в журналах, що

мають імпакт-фактор на рівні 1,9–3,3. Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо структурно-функціональної організації та еволюції АРСаз, механізмів редагування помилково синтезованих продуктів їхньої активності та методів молекулярного моделювання є стислим, але змістовним – таким, що демонструє високий рівень теоретичної підготовки автора.

У роботі використано широкий набір сучасних методів молекулярного моделювання, описаних у Розділі 2: біоінформатичні методи, гнучкий молекулярний докінг, моделювання молекулярної динаміки, методи структурного аналізу та аналізу міжмолекулярних взаємодій тощо.

Робота О. В. Раєвського мала на меті з'ясувати, використовуючи методи обчислювальної молекулярної біології, молекулярні механізми редагування АРСазами помилкових продуктів власної активності на прикладі кількох ферментів цього типу бактеріального та архейного походження. Отримані результати представлено у розділах 3–6.

Розділ 3 присвячено аналізу взаємодії лейцил-тРНК-синтетази (LeuRS) *Thermus thermophilus* із претрансферними субстратами (амінокислотами та аміноациладенілатами) та визначенню можливих механізмів претрансферного редагування. Автором створено моделі комплексів LeuRS з АМР та лейцином, ізолейцином, норваліном (Nva) і кількома іншими амінокислотами та проаналізовано їхню молекулярну динаміку. Продемонстровано, що взаємне розташування АМР і Pe (на відміну від Leu і Nva) повинно гальмувати реакцію утворення Pe-аденілату – таке гальмування було показано експериментально у роботах інших авторів. Дослідження комплексів LeuRS з аміноациладенілатами дозволило пояснити механізми захисту Leu- і Nva-аденілатів від гідролізу та причини підвищення ефективності гідролізу Pe-аденілату.

Наступна частина роботи була присвячена комплексам АРСаз із тРНК і механізмам пост-трансферного редагування. Але перед цим стояло завдання визначити найбільш коректні параметри розподілу зарядів в молекулах аміноацил-тРНК як елементах силового поля. Вирішенню цієї важливої

методичної задачі присвячено розділ 4. Автором визначено усереднену модель розподілу зарядів (коректність якої підтверджено у наступному розділі) і створено бібліотеку структур аміноацил-тРНК, придатних для моделювання молекулярної динаміки. Очевидною є важливість результатів, отриманих у цьому розділі, не тільки для інших частин дисертації, але і для інших дослідників, які можуть скористатись представленими розробками.

Розділ 5, який дещо порушує загальну композицію дисертації (див. зауваження нижче), складається з двох різнорідних підрозділів. Перший підрозділ присвячено перевірці розробленого автором методу параметризації на прикладі комплексу LeuRS *T. thermophilus* з Leu-тРНК^{Leu}. Автором переконливо показано, що застосований метод дійсно є більш адекватним для вивчення молекулярної динаміки аміноацил-тРНК у комплексах з АРСазами. У другому підрозділі проаналізовано комплекс ProRS *Enterococcus faecalis* з Ala-тРНК^{Pro}. На основі цього аналізу запропоновано цікавий механізм пост-трансферного редагування, який передбачає формування водневого зв'язка між 2'-ОН-групою рибози і карбонільним киснем аланілу, що полегшує реакцію гідролізу. Слід зазначити важливу позитивну обставину – ця частина роботи виконувалась у тісній колаборації зі співавторами О. В. Раєвського, які здійснювали експериментальні дослідження і квантово-хімічні розрахунки, що підтверджують запропонований механізм.

Розділ 6 викликає особливий інтерес. У ньому представлено результати аналізу комплексів двох LeuRS – бактеріального (*T. thermophilus*) і архейного (*Pirococcus horicoshii*) походження – із аміноацил-тРНК, що піддаються пост-трансферному редагуванню. Побудовано повнорозмірні моделі комплексів із використанням АРСаз дикого типу та їх мутантних форм, змодельовано молекулярну динаміку комплексів, проаналізовано можливі механізми пост-трансферного редагування і особливості гідролітичного відщеплення норваліну та ізолейцину від лейцинової аміноацил-тРНК, а також відмінності у механізмах гідролізу для бактеріальної та архейної АРСаз.

У Розділі 7, який присвячено аналізу отриманих результатів, автор, обговорюючи їх у загальному контексті даних інших дослідників, пропонує пояснення встановлених закономірностей та обговорює перспективи подальших досліджень.

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи О. В. Раєвського полягає в тому, що в ній, за допомогою сучасних методів обчислювальної молекулярної біології, створено і проаналізовано кілька моделей аміноацил-тРНК-синтетаз бактеріального і архейного походження у комплексах з різноманітними пре- і пост-трансферними субстратами і описано можливі молекулярні механізми пре- і пост-трансферного редагування та селективності АРСаз щодо амінокислот. Представлені у роботі дані збагачують знання щодо закономірностей функціонування та еволюції системи білкового синтезу. Важливе практичне значення має розроблений у роботі метод параметризації структур нуклеїнових кислот та їх компонентів, що не входять до стандартних біоінформатичних бібліотек. Наведені у дисертації результати і висновки знайдуть застосування перш за все в наукових дослідженнях у галузі молекулярної біології, а також у біотехнологічних розробках, що проводяться в академічних та освітніх установах, які працюють над вивченням молекулярних механізмів функціонування аміноацил-тРНК-синтетаз і пошуком нових підходів у лікуванні захворювань, викликаних помилками білкового синтезу, та нових препаратів проти інфекційних збудників.

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

До дисертаційної роботи О. В. Раєвського виникли наступні **зауваження та запитання.**

1. У Матеріалах і методах автор зазначає, що "при аналізі баз даних було визначено ряд структур, що задовольняють нашим задачам", та перераховує використані структури. Як можна зрозуміти, була обрана тільки частина наявних структур. За якими критеріями проводився цей вибір? Чому конкретно повинні були відповідати обрані структури?

2. На стор. 62 йде мова про "ступінь гомології", про який може свідчити так званий *e-value*. Цей параметр – імовірність випадкового співпадіння послідовностей – свідчить про ступінь їхньої подібності. Гомологія ж не є кількісним показником і не може мати ступеня.

3. Не зовсім вдалим є винесення матеріалу (важливого і цікавого) 5-го розділу в окремий розділ. На мою думку, перший підрозділ цього розділу було б доречніше перенести у попередній розділ 4: у розділі 4 описано метод параметризації, а у підрозділі 5.1 – його перевірка на конкретному прикладі. Підрозділ 5.2 стосується механізмів пост-трансферного редагування у проліл-тРНК-синтетази – його можна було б перенести у наступний розділ 6, де розглядаються пост-трансферні механізми лейцил-тРНК-синтетаз. До речі, при обговоренні результатів не вистачає порівнянь пост-трансферних механізмів у цих двох типів АРСаз.

4. Деякі рисунки і таблиці потребують уточнень. Так, на рис. 3.3 не позначено амінокислоти, для яких розраховувались RMSD і енергія електростатичних взаємодій. Незрозуміло, яка синтетаза представлена на частині *e* рис. 6.1 і чому там відповідають червоний і зелений кольори. У яких одиницях наведено час існування водневих зв'язків у табл. 6.1, 6.2?

5. У тексті дисертації у помітній кількості зустрічаються друкарські та пунктуаційні помилки, а також невдалі вирази. Наприклад, під "вільною енергією лігандів" (стор. 71), напевно, мається на увазі енергія їхньої взаємодії з ферментом. "Внутрішня енергія" і "внутрішнє напруження" аміноациладенілатів використані як синоніми (стор. 81), що не зовсім так. Із представленого матеріалу можна зрозуміти, що залишок Tyr43 виконує роль своєрідного щита, екрануючи карбоксильну групу лейцину, а не сама ця група є

щитом, як це сформульовано на стор. 82. Неканонічні амінокислоти можуть бути використані у біотехнологіях, але незрозуміло, як автор збирається вводити їх "в природу" (стор. 103).

Наведені зауваження не є принциповими і жодним чином не впливають на загальну *високу* оцінку розглянутої роботи.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Раєвського Олексія Володимировича "Молекулярна динаміка комплексів лейцил-тРНК-синтезас бактеріального та архейного походження із помилково синтезованими продуктами реакції аміноацилювання" 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 кафедри загальної та медичної 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



О. С. Коромис