

**Відгук офіційного опонента на дисертаційну роботу  
Раєвського О.В. «Молекулярна динаміка комплексів лейцил-тРНК-  
синтетаз бактеріального та архейного походження із помилково  
синтезованими продуктами реакції аміноацилювання»,  
представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук  
за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія**

Відомо, що аміноацил-тРНК-синтетаза активує окрему амінокислоту і приєднує її до кінцевого залишку рибози тРНК. Висока специфічність цього процесу забезпечується механізмами редагування, що відбуваються на стадіях після утворення первинного комплексу або після зв'язування з тРНК. Застосування молекулярної динаміки та інших комп'ютерних розрахунків для вивчення особливостей структури і механізмів редагування безумовно відкриває широкі можливості формування подальшої наукової стратегії у цьому напрямі. Дослідження механізмів функціонування аміноацил-тРНК-синтетаз бактеріального та архейного походження є важливим для формування наукових уявлень про формування живого світу, створення нових антибактеріальних препаратів, а також обґрунтування можливих біотехнологічних проектів. Тому немає сумніву, що тема дисертаційної роботи О.В. Раєвського, присвячена вивченню комплексів лейцил-тРНК-синтетаз із помилково синтезованими продуктами реакції аміноацилювання, є актуальною. Виконані дослідження були частиною планових науково-дослідних робіт у рамках відомчих тем і наукових грантів у відділі ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Мета дисертаційної роботи О.В. Раєвського полягала у моделюванні і дослідженні всіх ланок процесу аміноацилювання та редагування на прикладі лейцил-тРНК-синтетази із двох різних видів організмів бактеріального та архейного типів (*Thermus thermophilus*, *Pyrococcus horikoshii*) і була підпорядкована вирішенню низки завдань. Вони включали аналіз і підготовку доступних кристалічних структур цього ензиму та їх комплексів, проведення молекулярного докінгу субстратів пре- та пост-трансферного редагування в аміноацилювальний сайт і сайт редагувальних доменів, визначення параметрів топології субстратів та проведення молекулярної динаміки комплексів з лігандами, встановлення структурних особливостей забезпечення специфічності взаємодії різних лігандів пре- та пост-трансферного редагування з активними сайтами та можливих механізмів їх гідролізу.

Всі наукові положення, що обговорюються в дисертаційній роботі, є обґрунтованими. Вони стосуються як методологічних рішень в процесі досліджень методом молекулярної динаміки, так і запропонованих механістичних моделей процесів аміноацилювання та редагування за участю лейцил-тРНК-синтетази та деяких амінокислот. В дисертації подано огляд літератури, присвячений даним про аміноацил-тРНК-синтетази, їх еволюції на прикладі LeuRS, включаючи інформацію про механізми специфічності, редагування і будови активних сайтів. Результати досліджень та їх обговорення викладено в подальших чотирьох розділах, що стосуються визначення молекулярних основ специфічності LeuRS по відношенню до амінокислоти та можливих механізмів пре-трансферного редагування (розділ 3), вивченню молекули аміноацил-тРНК як елементу силового поля (розділ 4), валідації методів вивчення механізмів пост-трансферного редагування (розділ 5), вивченню механізмів пост-трансферного редагування в спеціалізованих доменах APCаз різних організмів (розділ 6). Матеріал добре систематизовано і він є достатнім для обґрунтування зроблених висновків. Всі результати є також достовірними. Вони отримані з використанням різних методів, таких як реконструкція білково-нуклеїнових комплексів, гнучкий молекулярний докінг, методи молекулярної динаміки, аналіз та інтерпретація енергії зв'язування лігандів, аналіз геометрії реакційних комплексів.

Дисертаційне дослідження О.В. Раєвського є новим і оригінальним. Аналіз наявної наукової інформації демонструє пріоритетність автора у обраному напрямі вивчення аміноацил-тРНК-синтетаз. Так, дисертантом вперше реконструйовано повноцінні моделі білково-нуклеїнових та ліганд-білкових комплексів бактеріальної LeuRS із *T.thermophilus*. Створено окрему модель взаємодії ССА-кінця тРНК і димеру ProRS при пост-трансферному редагуванні. На основі отриманих даних побудовано модель LeuRS архейного типу (*Pyrococcus horikoshii*). Встановлено природу відмінностей в аміноацилюванні і редагуванні різних субстратів. Наприклад, показано, що ймовірність утворення аміноациладенілату з подібних до лейцину амінокислот залежить від їх розміру та рухливості відносно молекули АМР у аміноацилювальному сайті зв'язування, а механізм захисту утворених аміноациладенілатів від пре-трансферного редагування визначається положенням ключових амінокислотних залишків аміноацилювального сайту відносно площини ангідридного зв'язку, кількістю обертових зв'язків та розгалуженістю амінокислотної частини аміноациладенілату. Всі авторські формулювання щодо наукової новизни одержаних результатів є об'єктивними.

Практичне значення представленої роботи полягає в розробці модельних підходів, які можуть бути застосовані для інших представників родини аміноацил-тРНК синтетаз. Дані про механізми пост-трансферного редагування можуть бути використані для цілеспрямованого пошуку і створення біоактивних сполук, що регулюють активність лейцил-тРНК-синтетаз, і на цій основі препаратів, спрямованих проти певних мікроорганізмів, в тому числі і як лікарських засобів.

Принципових зауважень щодо дисертаційної роботи О.В. Раєвського немає. Дисертація добре оформлена, проілюстрована необхідними рисунками і таблицями. Однак можна зазначити наступне.

1. Автором запропоновано можливі механізми пост-трансферного редагування за участю двох молекул води (на прикладі гідролізу Nva-A76 в редагувальному сайті LeuRSP<sub>h</sub>, або в редагувальному сайті LeuRST<sub>t</sub> із різницею у просторовій орієнтації молекул води). Участь двох молекул води в процесі нуклеофільної атаки на атом вуглецю карбонільної групи естерного фрагменту розглядається як активація однієї атакуючої молекули води іншою молекулою води, що в підсумку передбачає перенесення протону на залишок аспартату чи іншої амінокислоти. Проте слід зазначити, що важливою складовою загального процесу гідролізу естерного фрагменту є розрив зв'язку між містковим атомом кисню (2'-позиція) та атомом вуглецю, що відходить у складі карбоксильної групи. Як це може відбуватися з огляду на ймовірність стабілізації перехідного стану в процесі розриву цього зв'язку?

2. Автором визначено активуючу роль 3'-ОН групи рибози A76 у процесі гідролізу під час пост-трансферного редагування. Наскільки вичерпними є запропоновані автором механізми?

3. В роботі неодноразово порівнюються отримані результати з відомими експериментальними даними з посиланням на швидкість, каталітичну константу або константу дисоціації. Очевидно, говорячи про кореляції, варто було б викласти це детальніше. Слід також зауважити, що в тексті дисертації і автореферату іноді бракує ширшого викладу інформації щодо ілюстрацій. Зустрічаються невдалі вислови і друкарські помилки.

Однак, ці зауваження не є суттєвими. Вони не мають загального характеру і жодною мірою не впливають на високу позитивну оцінку дисертаційної роботи. Загалом, в результаті дисертаційного дослідження О.В. Раєвського отримано нові науково обґрунтовані результати, що стосуються структурних особливостей і молекулярних механізмів, які лежать в основі еволюційного пристосування лейцил-тРНК синтетаз до корегування помилок синтезу

аміноациладенілату і аміноацилювання тРНК. Методами комп'ютерного моделювання і молекулярної динаміки продемонстровано наявність структурних фрагментів та проаналізовано їх роль у забезпеченні селективності аміноацил-тРНК-синтетаз I класу на прикладі LeuRS стосовно низки амінокислотних субстратів.

Дисертаційна робота є цілеспрямованим фундаментальним дослідженням і має завершений характер. Вона має чітко сформульовану наукову мету і вміщує детальні результати та їх обговорення у відповідності до поставлених завдань. Значний за обсягом і значимий за змістом науковий матеріал опубліковано в 5 статтях у фахових журналах, 13 тезах доповідей на конференціях. Наукові публікації повністю відображають зміст представленої роботи. Головні положення дисертації і автореферату ідентичні. Висновки дисертаційної роботи виважені і повністю узагальнюють досягнення роботи.

Підсумовуючи викладене вище, можна зробити висновок, що дисертація О.В. Раєвського є завершеною працею, в якій отримано нові науково обґрунтовані результати в області молекулярної біології, що в сукупності вирішують конкретну наукову задачу, пов'язану з механізмами функціонування лейцил-тРНК-синтетаз бактеріального та архейного походження за наявності помилково синтезованих продуктів реакції аміноацилювання і є суттєвими для подальшого розвитку досліджень у цьому напрямку. Беручи до уваги актуальність обраної теми, достовірність, новизну і практичне значення отриманих результатів, а також обґрунтованість сформульованих наукових положень і висновків, вважаю, що дисертаційної робота «Молекулярна динаміка комплексів лейцил-тРНК-синтетаз бактеріального та архейного походження із помилково синтезованими продуктами реакції аміноацилювання» повністю відповідає вимогам пп. 9, 10, 12 та 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою КМУ № 656 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з постановами КМУ № 1159 від 19.08.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.), а О.В. Раєвський заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент –

чл.-кор. НАН України,

доктор хімічних наук, професор,

директор Інституту біоорганічної хімії

та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України



А.І. Вовк