

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

Вивчення структури і структурної динаміки молекулярних компонентів системи білкового синтезу є важливим напрямком сучасної молекулярної біології, який має велике значення для розуміння закономірностей функціонування біологічних систем. Важливе місце у таких дослідженнях займає комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки, методи якої інтенсивно розвиваються. Ключова роль у механізмах синтезу білка належить аміноацил-тРНК-синтетазам, дослідженню однієї з яких – тирозил-тРНК-синтетази людини – методами комп'ютерного моделювання і присвячено дисертаційну роботу О. В. Савицького. В роботі досліджено структурну динаміку цього ферменту, його взаємодії з деякими важливими партнерами і роль мутацій, пов'язаних з нейропатією Шарко-Марі-Туса. Оскільки усі ці питання залишаються недостатньо зрозумілими, тему дисертаційної роботи слід безперечно визнати **актуальною** як з фундаментальної, так і з прикладної точки зору.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень відділу білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Дисертація, що побудована за загальноприйнятою схемою, містить 146 сторінок, ілюстрована 42 рисунками і 7 таблицями, список використаних джерел містить 220 посилань, серед яких добре представлено роботи останніх років. Загалом, дисертація добре оформлена.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 16 публікацій, в тому числі 9 статей, серед яких 6 – у фахових наукових журналах. При цьому, 5 статей надруковано в журналах, що входять до наукометричної бази даних

Scopus, серед них 3 – у журналах з імпаکت-фактором на рівні між 2 і 4. Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо структурно-функціональних властивостей аміноацил-тРНК-синтетаз, молекулярних основ захворювання Шарко-Марі-Туса і сучасного стану комп'ютерної структурної біології є стислим, але змістовним – таким, що демонструє високий рівень теоретичної підготовки автора.

У роботі використано сучасні методи комп'ютерного моделювання структури і молекулярної динаміки біополімерів, описані у Розділі 2. Висока якість проведених досліджень не викликає сумніву.

Робота О. В. Савицького мала на меті провести комп'ютерне моделювання структури і молекулярної динаміки тирозил-тРНК-синтетази (TyrRS) та її мутантних форм, а також дослідити взаємодію ферменту з низкою субстратів. Отримані результати представлені у розділі 3.

Для вирішення поставлених завдань автору було необхідно провести велику підготовчу роботу: оптимізувати методики розрахунків і адаптувати їх для обчислень у ґрід-середовищі. Це дало можливість, з одного боку, вперше провести достатньо довгу молекулярну динаміку аміноацил-тРНК-синтетази – протягом 100 нс, що значно підвищує достовірність проведених обчислень. З іншого боку, за безпосередньої участі автора створено віртуальну лабораторію MolDynGrid, що функціонує в рамках Українського національного ґрїду. Зрозуміло, що цей результат дисертаційної роботи є вагомим сам по собі, оскільки дана лабораторія дає можливість оперувати більш великими об'ємами інформації при менших витратах машинного часу.

Ретельне дослідження молекулярної динаміки TyrRS дозволило автору з'ясувати характер взаємодій між структурними доменами ферменту. Моделювання молекулярної динаміки мутантних форм білка (після внесення *in silico* мутацій СМТ – мутацій, асоційованих із захворюванням Шарко-Марі-Туса) продемонструвало можливі наслідки мутацій як для конформації активного центру, так і для взаємодій з іншими білками-партнерами.

Наступним етапом роботи стало моделювання комплексів TyrRS та її мутантних форм з низькомолекулярними лігандами (L-тирозином, АТР та тирозил-аденилатом) і дослідження їхньої молекулярної динаміки. Показано, зокрема, що мутація G41R може призводити до суттєвого зниження спорідненості тирозину до його сайту зв'язування. Ретельно досліджені також взаємодії між TyrRS та тРНК^{Tyr} і висловлено припущення про можливий вплив мутацій на такі взаємодії. Цікавою частиною роботи було створення моделі потрійного комплексу TyrRS, тРНК^{Tyr} і фактору елонгації трансляції eEF1A2. Модель (яка, звісно, потребує експериментальних підтверджень) демонструє імовірну структуру такого комплексу, характер взаємодій між його компонентами і можливий вплив мутацій СМТ на ці взаємодії.

У Розділі 4, який присвячено аналізу отриманих результатів, автор, обговорюючи їх у загальному контексті даних інших дослідників, пропонує пояснення встановлених закономірностей та обґрунтовує висловлені гіпотези.

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи О. В. Савицького полягає в тому, що в ній отримані нові вагомні результати щодо структури і структурної динаміки тирозил-тРНК-синтетази людини і комплексів, утворених за участі цього ферменту, а також молекулярних механізмів впливу мутацій, асоційованих із захворюванням Шарко-Марі-Туса. Суттєвим результатом роботи є створення віртуальної лабораторії MolDynGrid, яка дозволить значно підвищити ефективність обчислень у комп'ютерних дослідженнях біологічних макромолекул та їх комплексів. Розроблені методичні підходи знайдуть широке використання у галузі структурної комп'ютерної біології. Представлені у роботі дані поглиблюють уявлення про молекулярні механізми роботи клітинного апарату білкового синтезу і відкривають шлях для подальших експериментальних досліджень аміноацил-тРНК-синтетаз. 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 механізмів трансляції і молекулярних основ захворювань.

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

Загалом, дисертація демонструє високий рівень кваліфікації автора – володіння сучасними методами, здатності аналізувати свої результати та узагальнювати їх. Разом з тим, до дисертаційної роботи О. В. Савицького виникли наступні **зауваження та запитання**.

1. Автор зазначає, що при створенні моделі просторової структури TyrRS ним було отримано 5 ансамблів по 100 структур у кожному, не наводячи жодних пояснень того, чим розрізнялись ці ансамблі.

2. Обговорення отриманих результатів не завжди виглядає достатнім. Так, у підсумках до підрозділу 3.3, з'являється твердження про те, що "отримані дані МД підтверджують гіпотезу" про відсутність цитокінової активності внаслідок взаємодій між N- і C-кінцевим модулями ферменту. Ця теза не викликає заперечень, але напрошується її обговорення, відсутнє в основному тексті. Аналогічно, припущення, що висловлюється у підсумку 4 до підрозділу 3.5, висловлюється саме у підсумку і більш ніде.

3. Пунктирні криві на рис. 3.24 практично не відображають нічого – для них слід було б змінити масштаб по осі ординат. Крім того, незрозуміло, що означають точки з цифрами на цьому рисунку. Нарешті, на рисунку відображено експонованість амінокислотних залишків, а не "аналіз експонованості", як зазначено у підписі.

4. Не зовсім коректним виглядає підсумок 2 по підрозділу 3.5: у підрозділі не представлено даних щодо впливу мутації del153-156VRQV на ступінь експонованості активного центру.

5. На початку підрозділу 3.6 автор констатує, що ним побудовані моделі комплексів ферменту з низькомолекулярними лігандами (L-тирозином, АТР і тирозил-аденілатом). По-перше, не вистачає зображень отриманих моделей

(крім моделі комплексу с L-тирозином, яка далі візуалізована). По-друге, тоді як для комплексу з L-тирозином далі проводилось моделювання молекулярної динаміки, залишається незрозумілим, з якою метою моделювались комплекси з АТР та тирозил-аденілатом: якщо про перший з цих комплексів сказано кілька слів у пункті 3.6.5.1, то модель другого ніяк більше не обговорюється.

6. Коментуючи рис. 3.37, автор стверджує, що врівноваження структури тРНК у комплексі з ферментом спостерігається після 40 нс молекулярної динаміки. Не зовсім зрозуміло, на якій підставі зроблено такий висновок: судячи з рисунку, врівноваження відбувається приблизно на 15 нс, після чого спостерігаються досить суттєві флуктуації RMSD, які не стають меншими після 40 нс. При цьому врівноваження структури *комплексу*, судячи з наступного рис. 3.38, дійсно спостерігається приблизно після 30 нс.

7. У роботі зустрічаються деякі синтаксичні помилки, некоректні вирази, неточності і т.п. Наприклад,

– Кілька разів у тексті автор використовує для позначення програмних продуктів слово "застосунок", яке не може не дивувати.

– Два типи кривих різного кольору на рис. 3.11 позначено як "C1", хоча, напевно, маються на увазі домени C1 і C2. Крім того, незрозуміло, що позначає стрілка на цьому рисунку.

– Ні в тексті, ні у підписі до рис. 3.12 не пояснено, що позначають цифри (4:2, 5:2 і т.д.) на цьому рисунку.

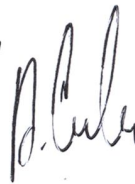
– Незрозуміло, як будь-яке спостереження може бути до чогось "подібним за молекулярним механізмом" (стор. 98)

– Невдало описано деякі моменти щодо моделювання структури комплексу TugRS із фактором елонгації трансляції ("накладено III-й домен структури на 3й домен комплексу", "видаливши наявні координати 4CXG, було отримано структуру HsTugRS у комплексі...", стор. 106).

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

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Савицького Олександра Вячеславовича “Комп’ютерне моделювання молекулярної динаміки *H. sapiens* тирозил-тРНК синтетази та її мутантних форм“ є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів, глибиною розкриття поставлених проблем, логічністю і обґрунтованістю висновків 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 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

Сиволоб А.В. (Звернувшись до А.В.)

