

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ**

На правах рукописи

Бояршин Константин Сергеевич

УДК 577.217.32

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ РЕДАКТИРУЮЩЕЙ
АКТИВНОСТИ ПРОЛИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗЫ ИЗ *Enterococcus faecalis***

03.00.03 - молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Яремчук Анна Дмитриевна

кандидат биологических наук,

старший научный сотрудник

КИЕВ-2016

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ВСТУПЛЕНИЕ	8
РАДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Аминоацил-тРНК синтетазы как класс ферментов	14
1.1.1. Классификация аминоацил-тРНК синтетаз	16
1.1.2. Модульная структура аминоацил-тРНК синтетаз	19
1.2. Проблема поддержания аминокислотной специфичности аминоацил-тРНК синтетазами	21
1.2.1. Методы изучения механизмов редактирования аминоацил-тРНК синтетазами	24
1.2.2 Редактирование у аминоацил-тРНК синтетаз 1-го структурного класса	25
1.2.2.1. ИлеРС	25
1.2.2.2. ВалРС	27
1.2.2.3. ЛейРС	28
1.2.2.4. МетРС	31
1.2.3. Редактирование у АРС 2-го структурного класса	31
1.2.3.1. АлаРС	32
1.2.3.2. ТреРС	33
1.2.3.3. ФенРС	35
1.2.3.4. СерРС	38
1.2.4. D-аминоацил деацилазы	38
1.2.5. Характерные черты редактирующих механизмов	39
1.3. Особенности пролил-тРНК синтетазы	41
1.3.1. Проблема редактирования пролил-тРНК синтетазой	42
РАДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	47
2.1. Материалы и оборудование	47

2.2. Плазмиды и штаммы	47
2.3. Методы работы с клетками <i>Escherichia coli</i>	48
2.3.1. Питательные среды для роста бактериальных клеток	48
2.3.2. Получение компетентных клеток <i>E. coli</i>	48
2.3.3. Трансформация бактериальных клеток	49
2.3.4. Нарращивание биомассы <i>E. coli</i> и индукция экспрессии белка	50
2.4. Методы работы с нуклеиновыми кислотами	50
2.4.1. Дизайн олигонуклеотидов	50
2.4.2. Амплификация ДНК с помощью полимеразной цепной реакции	51
2.4.3. Сайт-направленный мутагенез	51
2.4.4. Электрофорез и очистка фрагментов ДНК из геля	52
2.4.5. Рестрикция и лигирование фрагментов ДНК	53
2.4.6. Выделение плазмидной ДНК	53
2.4.7. Синтез РНК <i>in vitro</i>	54
2.4.8. Разрезание транскрипта и очистка тРНК	55
2.4.9. Выделение тРНК из клеток-продуцентов	55
2.4.10. Окисление тРНК периодатом натрия	57
2.4.11. Замена А76 тРНК на 2'd-А76 и 2'F-А76	57
2.5. Методы работы с белками	58
2.5.1. Электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях	58
2.5.2. Определение концентрации белка по методу Бредфорд	59
2.5.3. Выделение и очистка рекомбинантных ПроРС	59
2.6. Ферментативные реакции	61
2.6.1. Анализ акцепторной активности тРНК ^{Про}	61
2.6.2. Получение препаратов ¹⁴ С-аланил тРНК ^{ПроАла}	61
2.6.3. Анализ гидролиза аланил-тРНК ^{ПроАла}	62
2.6.4. Анализ гидролиза АТФ	62
2.6.5. Анализ гидролиза аланил-АМФ	62

РАЗДЕЛ 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	64
3.1. Клонирование и экспрессия тРНК ^{Про} и гибридной тРНК ^{ПроАла} <i>Enterococcus faecalis</i>	64
3.1.1. Клонирование и экспрессия тРНК ^{Про} <i>Ef</i>	65
3.1.1.1. Создание генноинженерной конструкции для экспрессии тРНК ^{Про} <i>E. faecalis in vitro</i>	65
3.1.1.2. Обеспечение правильной работы рибозима вируса круглой пятнистости табака, коэкспрессированного с тРНК ^{Про} <i>Ef</i>	66
3.1.1.3. Очистка и характеристика тРНК ^{Про} <i>Ef</i>	68
3.1.2. Клонирование и экспрессия гибридной тРНК ^{ПроАла} , узнаваемой пролил- и аланил-тРНК синтетазами	70
3.1.2.1. Выбор элементов узнавания химерной тРНК ^{ПроАла} <i>Ef</i>	70
3.1.2.2. Клонирование гена гибридной тРНК ^{ПроАла} , её экспрессия и очистка	71
3.1.2.3. Биохимические свойства тРНК ^{ПроАла} <i>Ef</i>	73
3.2. Изучение роли тРНК в претрансферном редактировании пролил-тРНК синтетазой	74
3.2.1 Характер тРНК-зависимости претрансферного редактирования ПроРС <i>Ef</i>	76
3.2.2 Модификация тРНК ^{Про} путём окисления периодатом натрия	78
3.2.3 Получение 2'- и 3'-dA76 производных тРНК ^{Про}	80
3.2.4 Влияние производных тРНК ^{Про} на претрансферное редактирование ПроРС <i>Ef</i>	81
3.3. Изучение редактирующего активного центра ПроРС <i>Ef</i> методом сайт-направленного мутагенеза	85
3.3.1. Выбор аминокислотных остатков редактирующего домена ПроРС для сайт-направленного мутагенеза	86
3.3.2 Получение мутантных форм ПроРС <i>Ef</i>	87
3.3.3 Анализ посттрансферной редактирующей активности мутантных форм ПроРС	88

3.4 Изучение роли тРНК ^{Про} в посттрансферном редактировании методом модификации тРНК	93
3.4.1 Модификация А76 тРНК ^{ПроАла} по 2'-положению рибозы	93
3.4.2 Биохимические свойства аланил -2'd-А76 -тРНК ^{ПроАла}	94
3.4.3 Модификация А76 тРНК ^{Про} по 2'-положению рибозы	95
3.4.4 Биохимические свойства пролил -2'd-А76 -тРНК ^{Про} и пролил-2'F-А76 тРНК ^{Про}	96
РАЗДЕЛ 4. АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	100
4.1. Претрансферное редактирование ПроРС <i>E. faecalis</i>	100
4.2. Посттрансферное редактирование ПроРС <i>E. faecalis</i>	104
4.2.1. Сопоставление экспериментальных данных с данными компьютерного моделирования	104
4.2.2. Обобщение полученных результатов	111
ВЫВОДЫ	126
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	128

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфорная кислота

АлаРС – аланил-тРНК синтетаза

АМФ – аденозинмонофосфорная кислота

АргРС – аргинил-тРНК синтетаза

АснРС – аспарагинил-тРНК синтетаза

АспРС – аспарагил-тРНК синтетаза

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВалРС – валил-тРНК синтетаза

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГисРС – гистидил-тРНК синтетаза

ГлиРС – глицил-тРНК синтетаза

ГлнРС – глутаминил-тРНК синтетаза

ГлуРС – глутамил-тРНК синтетаза

ГТФ – гуанидинтрифосфорная кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ДСН – додецилсульфат натрия

ДТТ – дитиотреитол

ДЭАЭ – диэтиламиноэтил

ИлеРС – изолейцил-тРНК синтетаза

ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

ЛейРС – лейцил-тРНК синтетаза

ЛизРС – лизил-тРНК синтетаза

МетРС – метионил-тРНК синтетаза

ос. ч. – особо чистый

ПААГ – полиакриламидный гель

ПроРС – пролил-тРНК синтетаза

ПроРС*Ef* – пролил-тРНК синтетаза *Enterococcus faecalis*

ПроРСЕс – пролил-тРНК синтетаза *Escherichia coli*
 ПСА – персульфат натрия
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 ПЭИ-целлюлоза – полиэтиленимин целлюлоза
 СерРС – серил-тРНК синтетаза
 ТирРС – тирозил-тРНК синтетаза
 ТреРС – треонил-тРНК синтетаза
 Трис – трис(гидроксиметил)аминометан
 тРНК^{ПроАла}*Ef* – тРНК^{ПроАла} *Enterococcus faecalis*
 тРНК^{Про}*Ef* – тРНК^{Про} *Enterococcus faecalis*
 тРНК^{Про}*Rp* – тРНК^{Про} *Rhodopseudomonas palustris*
 тРНК^{Про}*Ec* – тРНК^{Про} *Escherichia coli*
 ТрпРС – триптофанил-тРНК синтетаза
 ТХУ – трихлоруксусная кислота
 УТФ – уридинтрифосфорная кислота
 ФенРС – фенилаланил-тРНК синтетаза
 ЦисРС – цистеинил-тРНК синтетаза
 ЦТФ – цитидинтрифосфорная кислота
 ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
 НЕРЕС – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
 НРЛС – жидкостная хроматография высокого давления
 МОПС – 3-[N-Морфолино]пропансульфоновая кислота
 РИПЕС – пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновая кислота)
 РМСФ – фенилметансульфонилфлюорид
 QM – квантово-механический
 RMSD – среднее квадратичное расстояние
 TEMED – тетраметилэтилендиамин

ВСТУПЛЕНИЕ

Актуальность темы. Эволюционное развитие генетического кода сопровождалось установлением однозначного соответствия между кодонами мРНК и аминокислотными остатками синтезируемой полипептидной цепи. В ходе эволюции этот процесс требовал дивергенции аминоацил-тРНК синтетаз (АРС) и возрастания их специфичности. Специализация каждого из этих ферментов на узнавании одной конкретной аминокислоты достигла уровня, иногда называемого сверхспецифичностью. Этот уровень обеспечивается, в частности, редактированием.

Редактирование ошибок АРС – это специфический гидролиз продуктов, возникших вследствие связывания ферментом ошибочной аминокислоты. АРС используют целый набор редактирующих механизмов, их разнообразие отражает эволюционный путь становления генетического кода и рост точности белкового синтеза. Характеристика этих механизмов является одним из шагов к пониманию ранних этапов развития жизни.

Особый интерес вызывает гидролиз ошибочных конечных продуктов – аминоацил-тРНК, называемый посттрансферным редактированием. В частности, здесь есть примеры глубоких функциональных различий в работе гомологичных ферментов. Например, на сегодня известно, что посттрансферное редактирование у аланил-тРНК синтетазы (АлаРС) и треонил-тРНК синтетазы (ТреРС), несмотря на их гомологию (Veebe et al., 2003), происходит по абсолютно разным механизмам. Также по-разному гидролизуют ошибочные аминоацил-тРНК редактирующий домен пролил-тРНК синтетазы (ПроРС) и гомологичная деацилаза YbaK (Kumar et al., 2012, Kumar et al., 2013). Накопление данных о таких различиях и их дальнейшее осмысление позволят углубить представления о путях функциональной дивергенции ферментов. С другой стороны, накопление данных об отдельных примерах редактирования может позволить выявить общие особенности гидролиза АРС ошибочно синтезированных аминоацил-тРНК.

В редактирующих механизмах некоторых APC, в том числе и ПроРС (Kumar et al., 2012), принимают непосредственное участие функциональные группы тРНК, обеспечивая эффективность катализа деацилирования. Выявлен ряд примеров РНК-белкового катализа, промежуточного между рибозимальным катализом и работой большинства ферментов (Ling et al., 2007, Kang et al., 2012). Это углубляет наши представления о биокатализе, особенно в свете представлений о возникновении белковой жизни из «мира РНК».

Данные, полученные *in vivo* на прокариотических организмах (Cvetesic et al., 2014), подтверждают физиологическое значение редактирования APC. Это даёт потенциальную возможность использования веществ, блокирующих редактирующие активные центры APC, в качестве противомикробных препаратов. Также данные о редактирующих механизмах могут быть применены при разработке систем для синтеза искусственных белков, содержащих неприродные аминокислотные остатки, в частности, для обеспечения безошибочности такого синтеза.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертация отвечает тематике научно-исследовательских работ отдела энзимологии белкового синтеза Института молекулярной биологии и генетики НАНУ и выполнялась в рамках тем научных исследований 2.2.4.14 «Изучение молекулярных механизмов коррекционной активности аминоацил-тРНК синтетаз» (2005-2009), номер государственной регистрации 0105U003263; 2.2.4.14 «Изучение молекулярных основ точности трансляции генетического кода в процессе образования аминоацил-тРНК», номер государственной регистрации 0109U007245.

Цель и задачи исследования. Цель работы – охарактеризовать механизмы редактирования ПроРС бактерии *Enterococcus faecalis* аланил-тРНК^{Про}.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1) Клонировать ген тРНК^{Про}*Ef*, разработать методику экспрессии и очистки транскрипта тРНК^{Про}.

- 2) Для анализа посттрансферной редактирующей активности создать гибридную тРНК^{ПроАла}, способную быть аминоацилированной АлаРС и деацилированной ПроРС в ходе посттрансферного редактирования.
- 3) Оценить вклад избирательного высвобождения аланил-АМФ и его каталитического расщепления в претрансферное редактирование ПроРС.
- 4) Проверить влияние тРНК^{Про} на эффективность претрансферного редактирования и установить её ключевые структурные элементы, задействованные в этом процессе, путём её модификации.
- 5) Получить набор мутантных форм ПроРС*Ef*, несущих мутации в редактирующем домене, по аминокислотным остаткам, могущим участвовать в процессе посттрансферного редактирования, и экспериментально оценить их функциональное значение.
- 6) Проверить участие аланил-тРНК^{Про} в катализе посттрансферного редактирования ПроРС*Ef* и выдвинуть предположения о характере её участия в этом процессе, используя экспериментальные модели на основе модифицированных тРНК.
- 7) Сопоставить полученные данные с компьютерной моделью механизма посттрансферного редактирования ПроРС*Ef* аланил-тРНК^{Про}, полученной путём молекулярной динамики и квантово-химических вычислений.

Объект исследования – механизмы редактирования ПроРС*Ef*.

Предмет исследования – структурно-функциональная характеристика механизмов претрансферного и посттрансферного редактирования ПроРС*Ef*.

Методы исследования – сайт-направленный мутагенез ПроРС*Ef* и тРНК^{Про}, ферментативная модификация тРНК, постановка ферментативных и неферментативных химических реакций с радиоактивной меткой, сопоставление экспериментальных результатов с результатами компьютерного моделирования.

Научная новизна полученных результатов. Впервые показано тРНК-зависимое претрансферное редактирование у АРС второго структурного класса. Показана ведущая роль в этом процессе гидроксильных групп А76 тРНК^{Про}.

Установлена специфическая роль 2'-гидроксильной группы A76 тРНК^{Pro} в претрансферном редактировании, не сводимая к участию в связывании и позиционировании A76 тРНК^{Pro} в аминокатионном активном центре.

Показана каталитическая природа тРНК-зависимого и тРНК-независимого претрансферного редактирования ПроРСЕf, и частичное избирательное высвобождение аланил-АМФ в отсутствие тРНК^{Pro}.

Проведён исчерпывающий сайт-направленный мутагенез редактирующего активного центра ПроРСЕf по стратегии аланинового сканирования, позволивший установить вклад различных аминокислотных остатков в посттрансферное редактирование ПроРСЕf.

На двух разнородных экспериментальных моделях показана необходимость 2'-гидроксильной группы A76 тРНК^{Pro} для посттрансферного редактирования ПроРСЕf.

Экспериментально подтверждена новая квантово-химическая модель посттрансферного редактирования ПроРСЕf, впервые выполненная на основе полноразмерной модели структуры комплекса ПроРСЕf с аланил-тРНК^{Pro}, и существенно отличная от предложенной ранее. Согласно ней, катализ гидролиза аланил-тРНК^{Pro} идёт по кислотнo-основному, субстрат-ассистированному механизму. Нуклеофильная атака скоординированной молекулы воды облегчается водородным связыванием внутри субстрата кислорода карбонильной группы остатка аланина с 2'-гидроксильной группой рибозы A76 тРНК^{Pro}, усиливающим относительный положительный заряд на углероде карбонильной группы.

Практическое значение полученных результатов. Полученные системы экспрессии и отработанные методы очистки транскриптов тРНК^{Pro} Ef и тРНК^{ProАла} могут послужить для получения препаратов этих тРНК в целях их использования в дальнейших исследованиях аппарата белкового синтеза.

Данные о механизме посттрансферного редактирования могут быть использованы для обеспечения редактирования против аланина и пролина в

процессе создания на основе ПроРС и тРНК^{Про} ортогональных пар для введения в структуру синтезируемых белков неканонических аминокислот.

Личный вклад соискателя. Оценка литературных данных проведена диссертантом лично. Создание генноинженерных конструкций для экспрессии тРНК^{Про}*Ef* и гибридной тРНК^{ПроАла}, сайт-направленный мутагенез гена ПроРС *Ef*, выделение и очистка транскрипта тРНК^{ПроАла}, дикого типа и мутантных форм ПроРС, получение препаратов аланил-тРНК^{ПроАла} и пролил-тРНК^{Про}, постановка ферментативных и неферментативных реакций и анализ полученных данных были осуществлены лично соискателем.

Очистка тРНК^{Про}*Ef* и тРНК^{Про} *Rhodopseudomonas palustris* (тРНК^{Про}*Rp*) проводилась совместно с И. А. Крикливым. Автор выражает благодарность члену-корреспонденту НАН Украины М. А. Тукало за помощь в разработке стратегии исследований, анализе и обобщении результатов.

Слова искренней благодарности автор адресует непосредственному руководителю работы к.б.н. А. Д. Яремчук за руководство, полезные советы и замечания во время подготовки, проведения экспериментов и при обсуждении результатов работы. Полученные результаты изложены в совместных публикациях.

Апробация результатов диссертации. Основные положения диссертации докладывались на IX Украинском биохимическом съезде (Харьков, Украина, 2006), 12-й Международной пушинской школе-конференции молодых учёных (Пушино, Россия, 2008), конференции «Мосты в науках о жизни» (Загреб, Хорватия, 2008), 1-й Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» (Донецк, Украина, 2009), V Международном симпозиуме «Надмолекулярные системы в химии и биологии» (Киев, Украина, 2009), VII Парнасовской конференции по биохимии и молекулярной биологии (Ялта, Украина, 2009), Конференции молодых учёных ИМБГ НАНУ (Киев, Украина, 2010), Конференции молодых учёных ИМБГ НАНУ (Киев, Украина, 2011), VI Международной конференции молодых

учёных (Харьков, Украина, 2011), Форуме молодых учёных ФЕБО (Санкт-Петербург, Россия, 2013), XI Украинском биохимическом съезде (Киев, Украина, 2014), 19-й Международной пушинской школе-конференции молодых учёных (Пушино, Россия, 2015).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, из них 5 статей в рецензируемых научных журналах и тезисы 13 докладов в сборниках материалов международных и всеукраинских научных конференций.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из вступления, обзора литературы, материалов и методов исследования, экспериментальной части, анализа и обобщения результатов, выводов, списка использованных источников, который включает 134 наименования. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста, она содержит 36 рисунков и 5 таблиц.

РАЗДЕЛ 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Аминоацил-тРНК синтетазы как класс ферментов

Аминоацил-тРНК синтетазы (АРС) представляют собой ферменты, катализирующие специфическое аминоацилирование тРНК аминокислотами. В их активных центрах последовательно проходят две реакции – активация аминокислоты АТФ, сопровождающаяся образованием аминоацил-аденилата и высвобождением пирофосфата, и аминоацилирование тРНК с высвобождением АМФ (рис. 1.1). Узнавание одной из 20-ти тРНК (не считая изоакцепторных) и узнавание соответствующей ей аминокислоты необходимы для формирования правильного конечного продукта – аминоацил-тРНК, в которой антикодон тРНК соответствует присоединённому к ней аминокислотному остатку. Именно специфичность АРС определяет соответствие нуклеотидных триплетов генетического кода аминокислотам. Эта ключевая функция в реализации генетической информации определяет исключительно высокие требования к специфичности АРС.

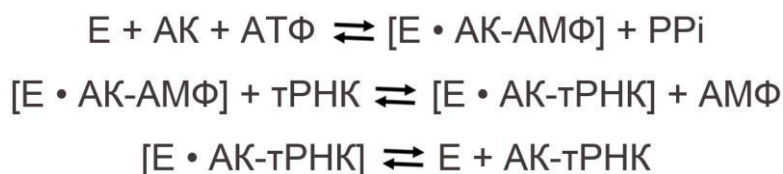


Рис. 1.1. Две стадии реакции аминоацилирования и высвобождение продукта. E – фермент, АК – аминокислота, PP_i – пирофосфат, АК-АМФ – аминоацил-аденилат, АК-тРНК – аминоацил-тРНК

До появления белковых АРС их функции выполняли молекулы РНК, что косвенно подтверждено искусственным созданием рибозимов, способных аминоацилировать свой 3'-конец или 3'-конец тРНК [7]. В дальнейшем АРС-

рибозимы оказались заменены белками, ведущими начало от двух предковых последовательностей [8]. Таким образом, структурно APC распадаются на два больших неродственных друг другу класса. Ферменты 1-го структурного класса узнаваемы по третичной структуре аминокацилирующего домена в виде параллельного β -листа, фланкированного α -спиралями, называемой также укладкой Россмана. По первичной структуре их позволяют узнать две короткие консервативные последовательности, образующие часть АТФ-связывающего центра. Для первого структурного класса характерно отсутствие четвертичной структуры – большинство из них мономеры. С функциональной точки зрения эти ферменты отличает связывание акцепторного стебля тРНК со стороны малой борозды (за исключением ТирРС и ТрпРС [9; 10]), и аминокацилирование в основном по 2'-гидроксильной группе А76 тРНК.

В основе структуры активного центра ферментов 2-го структурного класса лежит антипараллельный β -лист. Отличительными особенностями их первичной структуры выступают три гомологичные последовательности, участвующие во взаимодействии с тРНК, связывании АТФ и димеризации. Эти ферменты как правило являются гомодимерами, взаимодействуют с акцепторным стеблем тРНК со стороны большой борозды, и, кроме фенилаланил-тРНК синтетазы (ФенРС), аминокацилируют А76 тРНК по 3'-гидроксильной группе [11]. По гомологии первичной структуры и особенностям доменной организации каждый из классов дополнительно разделен на подклассы (табл. 1.1). Для APC характерна модульная структура, в которой к основному аминокацилирующему модулю крепятся антикодон-связывающий, редактирующий или другие модули, являющиеся более поздними эволюционными приобретениями. Такие модули в ходе эволюции иногда меняли своё положение в первичной структуре, встречались или встречаются в виде самостоятельных белков.

Доменная структура APC отображает поэтапное повышение требований к специфичности узнавания ими тРНК и аминокислот. При этом узнавание аминокислот представляет собой более сложную задачу. Если узнаванию тРНК

заданной специфичности благоприятствует способность её достаточно сложной структуры нести достаточное количество отличительных черт, становящихся детерминантами узнавания, то простая химическая структура такой малой молекулы, как аминокислота, предоставляет гораздо меньше таких возможностей. По этой причине, среди других характерных черт, ряд АРС обладает способностью к редактированию, то есть избирательному расщеплению собственных ошибочно синтезированных продуктов. Механизмы редактирования АРС отличаются удивительным разнообразием, которое также будет рассмотрено в настоящем обзоре.

1.1.1. Классификация аминокил-тРНК синтетаз. На основании сравнения первичных последовательностей и пространственных структур все АРС разделены на два класса [11]. Как правило, все известные АРС определённой специфичности относятся к одному и тому же классу. Единственным исключением стала ЛизРС 1-го класса, обнаруженная у архей и некоторых болезнетворных бактерий [13]. К 1-му классу относятся АРС, специфичные к аргинину, цистеину, глутамину, глутаминовой кислоте, лейцину, изолейцину, валину, метионину, тирозину и триптофану, а также, иногда, ЛизРС (табл. 1.1). АРС, специфичные к глицину, аланину, серину, треонину, аспарагину, аспарагиновой кислоте, пролину, гистидину, фенилаланину и, обычно, лизину, относятся ко 2-му классу. Также ко 2-му классу относятся неканонические пирролизил-тРНК синтетаза [14] и фосфосерил-тРНК синтетаза [15], дивергировавшие от фенилаланил-тРНК синтетазы (ФенРС) во времена последнего общего предка [16; 17].

АРС каждого структурного класса несут общие для них гомологичные мотивы, обладают характерной топологией активного центра, четвертичной структурой, способом связывания тРНК и АТФ, придерживаются определённого места крепления аминокислоты на 3'-аденине тРНК, имеют общую скорость-лимитирующую стадию реакции. По сходству первичной последовательности и третичной структуры каталитического домена АРС каждого класса делятся на ряд подклассов (табл. 1.1) [12].

Таблица 1.1

**Классификация АРС, их четвертичная структура и редактирующая
активность**

Класс 1	Структура	Редактирование	Класс 2	Структура	Редактирование
Подкласс 1А			Подкласс 2А		
МетРС	α, α_2	Гомоцистеин	СерРС	α_2	Треонин, цистеин
ЛейРС	α	Норвалин, изолейцин	ПроРС	α_2	Аланин, цистеин
ИлеРС	α	Валин, цистеин	ТреРС	α_2	Серин
ВалРС	α	Треонин	ГлиРС	α_2	
			ГисРС	α_2	
Подкласс 1В			Подкласс 2В		
ЦисРС	α, α_2		АспРС	α_2	
ГлнРС	α		АснРС	α_2	
ГлуРС	α		ЛизРС	α_2	Гомоцистеин, гомосерин
Подкласс 1С			Подкласс 2С		
ТирРС	α		ФенРС	$(\alpha\beta)_2, \alpha$	Тирозин, изолейцин
ТрпРС	α_2		ГлиРС	$(\alpha\beta)_2$	
			АлаРС	α_2, α	Серин, глицин
Подкласс 1D			Селеноцистеинил-РС	α_4	
АргРС	α_2		Пирролизил-РС	α_2	
Подкласс 1Е					
ЛизРС	α				

APC первого структурного класса несут два характерных мотива, обычно обозначаемые HIGH и KMSKS. Более точно их последовательности выглядят как hΦGh и kmsKs. Второй структурный класс несёт три характерных последовательности: gΦxxΦxxPΦΦ, fRxe-h/rxxxfxxx(d/e) и gΦgΦgΦ(d/e)RΦΦΦΦΦ. «Φ» здесь обозначает гидрофобный аминокислотный остаток, «x» – любой остаток. Маленькая буква, подчёркнутая маленькая буква и подчёркнутая большая буква обозначают консервативный, высоко консервативный и абсолютно консервативный остатки [18]. Структурно оба мотива первого класса, а также второй и третий мотивы второго класса участвуют в формировании АТФ-связывающего центра и вовлечены в стабилизацию переходного состояния реакции активации аминокислоты [19]. Первый мотив второго структурного класса задействован в формировании четвертичной структуры APC [20].

Мотивы первичной структуры сближены в третичной структуре каталитических доменов обоих классов APC. При этом каталитический домен первого класса образует $\beta_5\alpha_4$ структуру с параллельными β -тяжами, называемую укладкой Россмана. Эта нуклеотид-связывающая структура была также обнаружена в дегидрогеназах [21]. Каталитический домен второго класса APC имеет в своей основе структуру из семи антипараллельных β -тяжей, окружённых α -спиралями [22]. Гомологичная структура была обнаружена также в биотин-синтетазах [23].

Отличается и пространственная ориентация тРНК при её связывании APC двух классов. APC первого класса стыкуются с акцепторным стеблем тРНК со стороны малой борозды, в то время как второй класс контактирует с ним со стороны большой борозды. Соответственно, вариабельная петля тРНК, связанной с APC первого класса, экспонирована в раствор, а в случае APC второго класса – контактирует с глобулой фермента [19]. Впрочем, эта закономерность имеет свои исключения, ТирРС и ТрпРС первого класса взаимодействуют с тРНК характерным для ферментов второго класса образом [9; 10].

Различные способы связывания акцепторного стебля тРНК двумя классами АРС обуславливают различие в характере прикрепления аминокислот. Как правило, АРС первого класса переносят аминокислотные остатки на 2'-гидроксильную группу рибозы А76 тРНК, в то время как ферменты второго класса – на 3'-гидроксильную группу. Исключением является ФенРС второго класса, прикрепляющая остаток фенилаланина к кислороду 2'-гидроксильной группы. ТирРС, ТрпРС и ЦисРС первого класса могут переносить аминокислотные остатки как на 2', так и на 3'-гидроксильную группу [24; 25].

АРС первого класса обычно существуют в виде мономеров, за исключением ТирРС и ТрпРС, способных существовать в виде гомодимеров. Также, МетРС у различных таксонов может представлять собой как гомодимер, так и мономер. АРС второго класса существуют в виде олигомеров, преимущественно гомодимеров. Среди них исключениями являются АлаРС эукариот и ФенРС митохондрий, представляющие собой мономеры. Большинство ФенРС и ГлиРС имеют четвертичную структуру $\alpha_2\beta_2$.

Скорость-лимитирующим процессом аминоацилирования тРНК АРС первого класса является освобождение аминоацил-тРНК из постреакционного комплекса, открывающее возможность для связывания новой неаминоацилированной тРНК. Для АРС второго класса скорость-лимитирующей стадией является активация аминокислоты [26]. Таким образом, два класса АРС глубоко различаются между собой не только структурно, но и функционально.

1.1.2. Модульная структура аминоацил-тРНК синтетаз. Анализ структуры АРС выявил модульный состав этих ферментов. Центральное место в их структуре занимает класс-специфический каталитический домен, на концах которого, или же в середине, расположены другие домены. Модульная организация АРС была впервые показана в экспериментах по контролируемому протеолизу МетРС *Escherichia coli* [27]. Более поздние исследования делеционных мутантных форм АлаРС продемонстрировали линейное

расположение различных доменов, отвечающих за олигомеризацию, связывание тРНК и её аминоацилирование [28]. С накоплением данных о последовательности и пространственной структуре АРС стало понятным, что модульная структура является для них правилом [29]. Среди двадцати канонических АРС путём сравнения первичных последовательностей было обнаружено 57 модулей, не считая двух типов аминоацилирующих доменов [30]. Одни из них сопутствуют АРС определённой специфичности, другие встречаются у различных АРС, принадлежащих к определённому подклассу или классу. Существуют и модули, встречающиеся у АРС обоих классов. Часть модулей встречается только в одном из таксонов, у эукариот и/или архей, либо у прокариот. Нередко модули АРС имеют гомологов, существующих как отдельные белки.

В составе всех современных АРС присутствует тРНК-связывающий домен. Он вносит вклад в селективное связывание узнаваемых ферментом изоакцепторных тРНК. Появление этих модулей относят ко времени возникновения генетического кода [31]. В структуре АРС может присутствовать и несколько различных доменов, взаимодействующих с тРНК, помимо каталитического домена, связывающего её акцепторный стебель.

Ряд модулей АРС выполняют редактирующую функцию, обеспечивая исправление ошибок узнавания аминокислот, допущенных при аминоацилировании тРНК. Их наличие и структура непостоянны в ряду таксонов. Наиболее распространённым редактирующим модулем является СР1 (connective peptide 1) [32], характерный для АРС первого класса: ВалРС, ИлеРС и ЛейРС. Этот домен прерывает первичную структуру каталитического домена названных ферментов.

У АРС второго класса редактирующие модули более разнообразны. Так, у ТреРС за узнавание и деацилирование серил-тРНК^{Trp} отвечает N-концевой домен N2 [33]. Он присутствует у бактериальных и эукариотических ТреРС, но отсутствует у архей, а также у митохондрий [34]. Редактирующий домен, гомологичный домену N2 бактерий, распространён среди АлаРС всех царств

живой природы [1]. Его структурный и функциональный гомолог AlaXp существует в виде отдельно кодируемого белка, вне структуры АлаРС [35]. Также существуют отдельные гомологи редактирующего домена ПроРС – ins-домена. Это белок YbaK у прокариот и ProX у эукариот [36; 44].

Эукариотические АРС, помимо коровой части, гомологичной базовому набору модулей прокариот, зачастую обладают N- или C-концевыми удлинениями, характерными только для них. Сюда относятся, в первую очередь, дополнительные тРНК-связывающие домены, лизин-богатые домены, повторяющиеся мотивы, домены гомологи ЕМАРП, и домены, необходимые для образования мультисинтетазных комплексов, характерных для эукариот [29].

1.2. Проблема поддержания аминокислотной специфичности аминоацил-тРНК синтетазами

Проблема несоответствия между тесным сходством ряда аминокислот и наблюдаемой точностью белкового синтеза впервые была поставлена Л. Полингом в 1957 году [38]. По его расчётам, для аминокислот, различающихся одной метильной группой (аланин – глицин, изолейцин – валин), разница в энергии связывания при взаимодействии с ферментом должна была составить около 1 ккал/моль, что позволило бы ферменту ошибаться не реже чем в одном случае из пяти. Дальнейшие исследования скорректировали энергию связывания метильной группы с ферментом до 3,4 ккал/моль [39], что соответствует ошибке узнавания в одном случае из двухсот. Но и эта цифра по меньшей мере на два порядка отличается от реально наблюдаемого уровня ошибок в первичной структуре белков, составляющего 10^{-4} - 10^{-5} [40; 41]. Таким образом, сверхспецифичность аминоацилирования тРНК АРС не во всех случаях может быть объяснена одной лишь специфичностью узнавания аминокислоты в аминоацилирующем активном центре. Необходим механизм,

дополняющий первичное узнавание, и существенно повышающий возможности фермента по различению схожих аминокислот.

Впервые работу такого механизма удалось наблюдать у ИлеРС *E. coli* [42]. Было показано, что ИлеРС образует как изолейцил-АМФ, так и валил-АМФ, но в присутствии тРНК^{Иле} остаток изолейцина переносится на тРНК, а валил-аденилат гидролизуется без переноса остатка валина. Эти результаты позволили сформулировать концепцию кинетического редактирования, согласно которой превращение аминоксил-аденилата, в зависимости от задействованного в его формировании аминокислотного остатка, может идти как по пути формирования аминоксил-тРНК, так и по пути гидролиза [43; 44]. В дальнейшем специфический гидролиз ошибочно синтезированного аминоксил-аденилата будет рассматриваться как механизм претрансферного редактирования, наряду со специфическим высвобождением негидролизованного аминоксил-аденилата в раствор [45; 46].

Вскоре был открыт другой механизм редактирования, основанный на деацилировании ошибочно синтезированной тРНК и названный впоследствии посттрансферным редактированием. Частный случай посттрансферного редактирования, изученный на ИлеРС, послужил для создания концепции двойного сита (рис. 1.2), согласно которой в обеспечении специфичности редактирующих АРС участвуют два активных центра – аминоксиллирующий и удалённый от него редактирующий. Аминоксиллирующий активный центр играет роль "грубого сита", пропускающего как свою, так и меньшие по размерам аминокислоты, давая им возможность быть активированными в реакции с АТФ и участвовать в аминоксиллировании тРНК. Роль "тонкого сита" играет редактирующий активный центр, куда проходят присоединённые к тРНК аминокислотные остатки, в случае если они по размерам меньше, чем требуемый.

Прошедшие в редактирующий активный центр аминокислотные остатки гидролизуются. Таким образом, узнавание происходит дважды, позволяя отсеять

как более крупные, так и более мелкие чем требуемая аминокислоты, даже если стерически они очень похожи [47; 48].

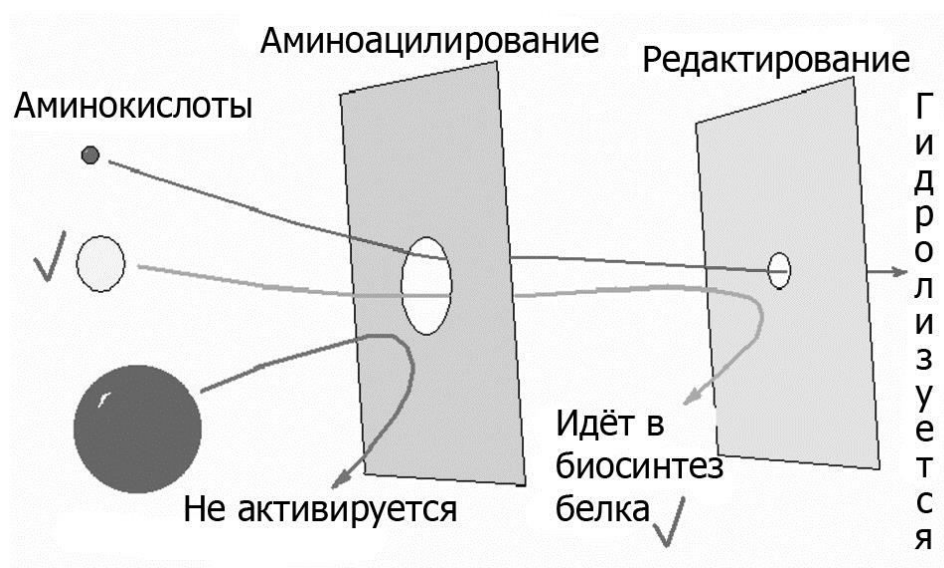


Рис. 1.2. Концепция «двойного сита». Более крупные аминокислоты, чем нужная, отсекаются на этапе активации, более мелкие – на этапе редактирования.

Данная модель не описывает всего разнообразия существующих механизмов редактирования, но имеет важное значение для понимания необходимости двух активных центров у большинства редактирующих АРС. Фактор размера может быть заменён стерическим соответствием аминокислоты активному центру или наличием и расположением определённых химических групп, однако, суть концепции двойного узнавания остаётся в силе.

Согласно современным представлениям, набор механизмов редактирования выглядит следующим образом. Претрансферным редактированием называют специфический гидролиз либо высвобождение в раствор ошибочно синтезированного аминоксил-аденилата. Такое редактирование может быть тРНК-независимым, если его скорость не зависит от присутствия тРНК, или тРНК-зависимым, если присутствие тРНК повышает его скорость. Посттрансферным редактированием называют специфический гидролиз ошибочно синтезированных аминоксил-тРНК [49]. Такое

редактирование может осуществляться в активном центре одного из доменов APC (*in cis*), либо в активном центре свободной деацилазы (*in trans*) [35]. Различные виды редактирования могут осуществляться одной молекулой, если претрансферное редактирование пропускает существенную часть ошибочно активированных аминокислотных остатков [50].

1.2.1. Методы изучения механизмов редактирования аминоксил-тРНК синтетазами. Для экспериментального определения редактирующей активности APC используют три основных подхода. Первый из них основан на накоплении меченой АМФ. В присутствии узнаваемой аминокислоты и АТФ APC синтезирует аминоксил-аденилат и удерживает его в своём активном центре до подхода тРНК. Если в смеси тРНК нет, активные центры всех молекул фермента оказываются занятыми аминоксил-аденилатом, реакция прекращается, и накопления АМФ не происходит. В присутствии редактируемой аминокислоты ошибочно синтезированные молекулы аминоксил-аделата гидролизуются, активный центр фермента при этом снова и снова освобождается для очередной реакции активации. Возникающий цикл синтеза и гидролиза аминоксил-аденилата редактируемой аминокислоты вызывает быстрый расход АТФ и накопление АМФ. В присутствии тРНК и узнаваемой аминокислоты все молекулы тРНК быстро оказываются аминоксиллированы, и скорость реакции опускается до скорости их спонтанного деацилирования. Если же в смеси находится редактируемая аминокислота, в присутствии тРНК в накопление АМФ могут вносить вклад любые из процессов редактирования [51].

Второй подход к детекции редактирования основан на гидролизе меченой аминоксил-тРНК. Он требует предварительно провести аминоксиллирование тРНК радиоактивно-меченым редактируемым аминокислотным остатком. Полученная аминоксил-тРНК в присутствии APC связывается с ней и гидролизуется в её редактирующем активном центре. Для этого APC должна быть специфична к данной тРНК, и обладать способностью к

посттранскрипционному редактированию против присоединённого к ней аминокислотного остатка [51].

Третий подход заключается в детекции аминоацил-тРНК – продукта ошибочного аминоацилирования, за счёт присоединения редактируемой аминокислоты к меченой тРНК [50]. Для обнаружения продукта в небольших количествах тРНК метят по фосфору А76, аминоацилируют редактируемой аминокислотой, расщепляют ССА-конец и разделяют путём тонкослойной хроматографии меченые Ар и аминоацил-Ар [51].

Помимо биохимических методов, огромную роль в изучении механизмов редактирования играют кристаллографические исследования [18] и различные методы компьютерного моделирования [52; 53].

1.2.2. Редактирование у аминоацил-тРНК синтетаз 1-го структурного класса. В настоящее время известно о наличии функции редактирования у девяти АРС: ИлеРС, ЛейРС, ВалРС и МетРС первого структурного класса, а также ПроРС, ТреРС, АлаРС, ФенРС и СерРС II-структурного класса. Помимо этого, продукты ряда АРС редактируются *in trans* свободными деацилазами. Все редактирующие АРС первого класса содержат в своей структуре домен СР1 (connective peptide 1). У трёх из них, ИлеРС, ЛейРС и ВалРС, он функционален, и осуществляет посттранскрипционное редактирование.

1.2.2.1 ИлеРС. Изолейцил-тРНК синтетаза (ИлеРС) ошибочно активирует валин в 200 раз менее эффективно ($0,5 \cdot 10^{-2}$), чем изолейцин [47], что выше допустимого уровня ($10^{-3} - 10^{-4}$). Для предотвращения аминоацилирования тРНК^{Иле} валином фермент располагает различными механизмами редактирования. Меньший вклад в поддержание аминокислотной специфичности способен вносить тРНК-независимое претранскрипционное редактирование, в ходе которого расщепляется не более 3% редактируемых соединений. Эффективность претранскрипционного редактирования значительно повышается при присутствии тРНК. Как тРНК-независимый, так и тРНК-зависимый гидролиз валил-аденилата происходит в аминоацилирующем активном центре [50], хотя ранее предполагалось его осуществление в активном центре особого

редактирующего домена CP1 [54; 55]. Для осуществления тРНК-зависимого претрансферного редактирования необходимы 2'- и 3'-ОН А76 тРНК^{Иле} [56]. Снижение тРНК-зависимого претрансферного редактирования ИлеРС, несущей мутации в активном центре CP1-домена, и лишённой посттрансферной редактирующей активности [50], может свидетельствовать о необходимости взаимодействия ССА-конца тРНК с CP1-доменом для наведения конформационных изменений на аминокацилирующий активный центр.

В основе распределения ошибочно синтезированных продуктов между претрансферным и посттрансферным редактированием ИлеРС лежит конкуренция воды и 2'-ОН А76 тРНК^{Иле} в аминокацилирующем активном центре за углерод карбонильной группы остатка редактируемой аминокислоты. Сопоставление скоростей тРНК-зависимого претрансферного редактирования и переноса остатка валина на тРНК^{Иле} указывает на реальное участие в обеспечении аминокислотной специфичности как претрансферного, так и посттрансферного редактирования, приблизительно в равной пропорции [50]. Посттрансферное редактирование ИлеРС осуществляется в редактирующем домене CP1, гомологичном соответствующим доменам ВалРС, ЛейРС и МетРС [57]. Активный центр CP1-домена находится на расстоянии около 30 Å от аминокацилирующего активного центра, в ограниченном консервативными аминокислотными остатками треонин-богатом углублении, стерически исключаящем связывание остатка изолейцина, но специфически связывающем валин [58]. Как и у большинства редактирующих АРС, для осуществления посттрансферного редактирования ССА-конец Валил-тРНК^{Иле} должен перебрасываться из аминокацилирующего активного центра в редактирующий, в то время как остальная часть молекулы остаётся связанной с ферментом [38] (рис. 1.3). Существенным отличием ИлеРС от других редактирующих АРС является необходимость переаминоацилирования редактируемой аминокислоты с 2'- на 3'-ОН А76 тРНК^{Иле} для её гидролиза в посттрансферном редактировании [56].

1.2.2.2. ВалРС. Валил-тРНК синтетаза (ВалРС) активирует изостеричный валину треонин с частотой $0,25 \cdot 10^{-2}$ [59]. Этот фермент характеризуется незначительным уровнем тРНК-независимого претрансферного редактирования, дополнительно снижающимся в присутствии тРНК^{Вал}. По причине быстрого переноса на тРНК^{Вал} остатка треонина с треонил-аденилата, в

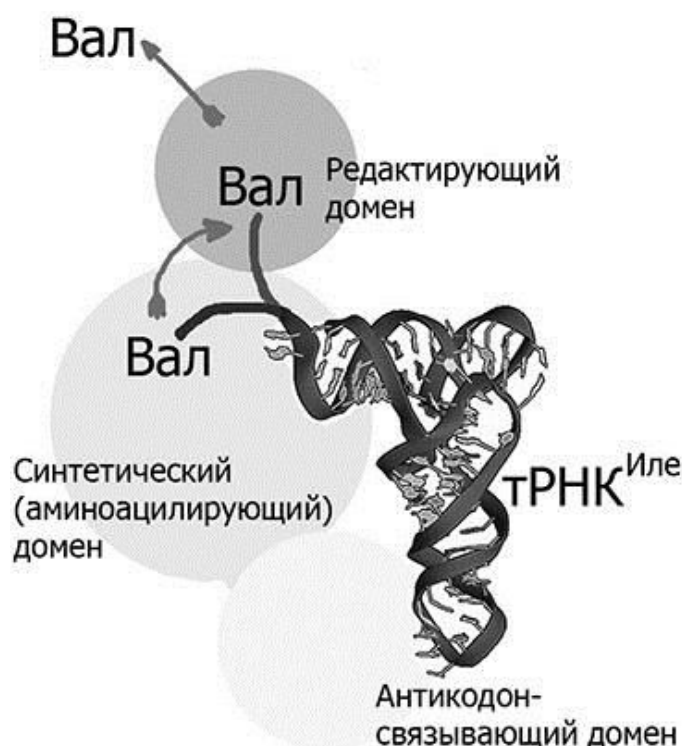


Рис. 1.3. Посттрансферное редактирование у большинства АРС, в том числе ИлеРС, требует изменения конформации одноцепочечного 3'-конца аминоксил-тРНК для транслокации аминокислотного остатка из аминоксилующего активного центра в редактирующий

претрансферном редактировании ВалРС успеваает гидролизовать лишь 1/200 всех редактируемых субстратов, а основная роль принадлежит посттрансферному редактированию [50].

Посттрансферное редактирование ВалРС осуществляется в обособленном редактирующем CP1-домене, гомологичном соответствующим доменам ИлеРС, ЛейРС и МетРС [60]. В отличие от ИлеРС, остаток редактируемой аминокислоты в посттрансферном редактировании не переаминоацилируется и

гидролизуется с 2'-ОН A76 тРНК^{Вал}, к которому он и был присоединён в аминоацилирующем активном центре. Тем не менее в эксперименте деацилирование 3'-dA76 треонил-тРНК^{Вал} снижено на порядок, а 3'-FA76 треонил-тРНК^{Вал} – на два порядка, что свидетельствует об определённой роли 3'-ОН A76 Тре-тРНК^{Вал} в посттрансферном редактировании [56].

1.2.2.3. ЛейРС. Лейцил-тРНК синтетаза (ЛейРС) ошибочно активирует норвалин, изолейцин, метионин и гомоцистеин. Потенциально наиболее опасен из них норвалин. Константа связывания ЛейРС для него примерно в 30 раз больше, чем для лейцина, а каталитическая константа меньше всего втрое. Норвалин активируется ЛейРС *E. coli* в 70 раз менее эффективно, чем лейцин, в то время как изолейцин – в 3500 раз менее эффективно [6; 61]. Против ошибочно активируемых аминокислот фермент способен осуществлять как претрансферное, так и посттрансферное редактирование.

Претрансферное редактирование против норвалина в отсутствие тРНК происходит в аминоацилирующем активном центре. Этот механизм у ЛейРС *Aquifex aeolicus* способен обеспечивать 7% от редактирующей активности, наблюдаемой в присутствии тРНК^{Лей}. При этом против изолейцина его действие не наблюдается [61]. Кроме того, ЛейРС осуществляет претрансферное редактирование против гомоцистеина с образованием тиолактона гомоцистеина, как и МетРС [62] (см. ниже).

Посттрансферное редактирование у ЛейРС осуществляется в активном центре редактирующего домена CP1, вставленного в укладку Россмана, и гомологичного редактирующим доменам ИлеРС и ВалРС. Аминоацилирование тРНК приводит к изменению конформации аминоацилирующего активного центра, запуская взаимный поворот аминоацилирующего, цинк-связывающего и редактирующего доменов. При этом ослабляется связывание тРНК, меняется положение её акцепторного стебля, и ССА-конец перебрасывается для контакта с редактирующим доменом [63].

Согласно данным, полученным *in vivo*, для выживания и деления *E. coli* нет необходимости в посттрансферном редактировании ЛейРС против

изолейцина, а редактирование против норвалина жизненно необходимо лишь при кислородном голодании, когда концентрация этого метаболита в цитоплазме возрастает [6]. Эксперименты с кокристаллизацией аналогов норвалил-тРНК^{Лей} и норвалил-аденилата с ЛейРС *Thermus thermophilus* показали возможность связывания в активном центре редактирующего CP1-домена субстратов как посттрансферного, так и претрансферного редактирования сходным образом. Наибольшее значение для гидролиза имеет фиксация аминогруппы редактируемой аминокислоты консервативными остатками аспарагиновой кислоты и метионина. Также ключевое значение имеют два соседствующих остатка треонина из треонин-богатого участка CP1-домена, связывающие рибозу А76 аминоксил-тРНК^{Лей} либо фосфат аминоксил-аденилата. Боковая цепь редактируемой аминокислоты находится в гидрофобном кармане глобулы фермента. Замена на аланин остатка треонина 252, участвующего в формировании этого кармана, и способного стерически исключать связывание боковой цепи лейцина, ведёт к потере специфичности редактирования и гидролизу Лей-тРНК^{Лей}. Субстрат посттрансферного редактирования располагается удобным образом для гидролиза молекулой воды, скоординированной с 3'-ОН А76. Редактирующим активным центром ЛейРС *T. thermophilus* включает и другую скоординированную молекулу воды, взаимодействующую с остатком аспарагиновой кислоты [104].

Согласно данным компьютерного моделирования проходящей в редактирующем активном центре ЛейРС *T. thermophilus* химической реакции, 3'-ОН А76 ошибочно аминоксиллированной тРНК^{Лей} активирует молекулу воды для гидролиза эфирной связи. Один из водородов этой молекулы в результате реакции оказывается ковалентно связанным с 2'-О [53] (рис. 1.4). На протяжении всей реакции протон 3'-гидроксильной группы остаётся связанным с боковой группой Тре248 белковой цепи. При этом боковая цепь Тре247 и вторая молекула воды стабилизируют тетраэдральное промежуточное соединение. Другая аналогичная модель [65], выполненная для того же объекта, также отводит ключевую роль в активации воды для нуклеофильной атаки 3'-

ОН, как акцептору водородной связи. Как и в предыдущей модели, 2'-гидроксильную группу А76 тРНК^{Лей} формирует один из протонов молекулы воды, осуществившей нуклеофильную атаку [65].

Таким образом, тРНК^{Лей} непосредственно выполняет каталитическую функцию в деацилировании ошибочных продуктов ЛейРС. При этом белок усиливает каталитическую активность 3'-ОН через сеть водородных связей и стабилизирует переходное состояние во время реакции. На основании данных моделирования, гибридный рибозимно-белковый катализ был постулирован как новая энзимологическая категория [53; 5].

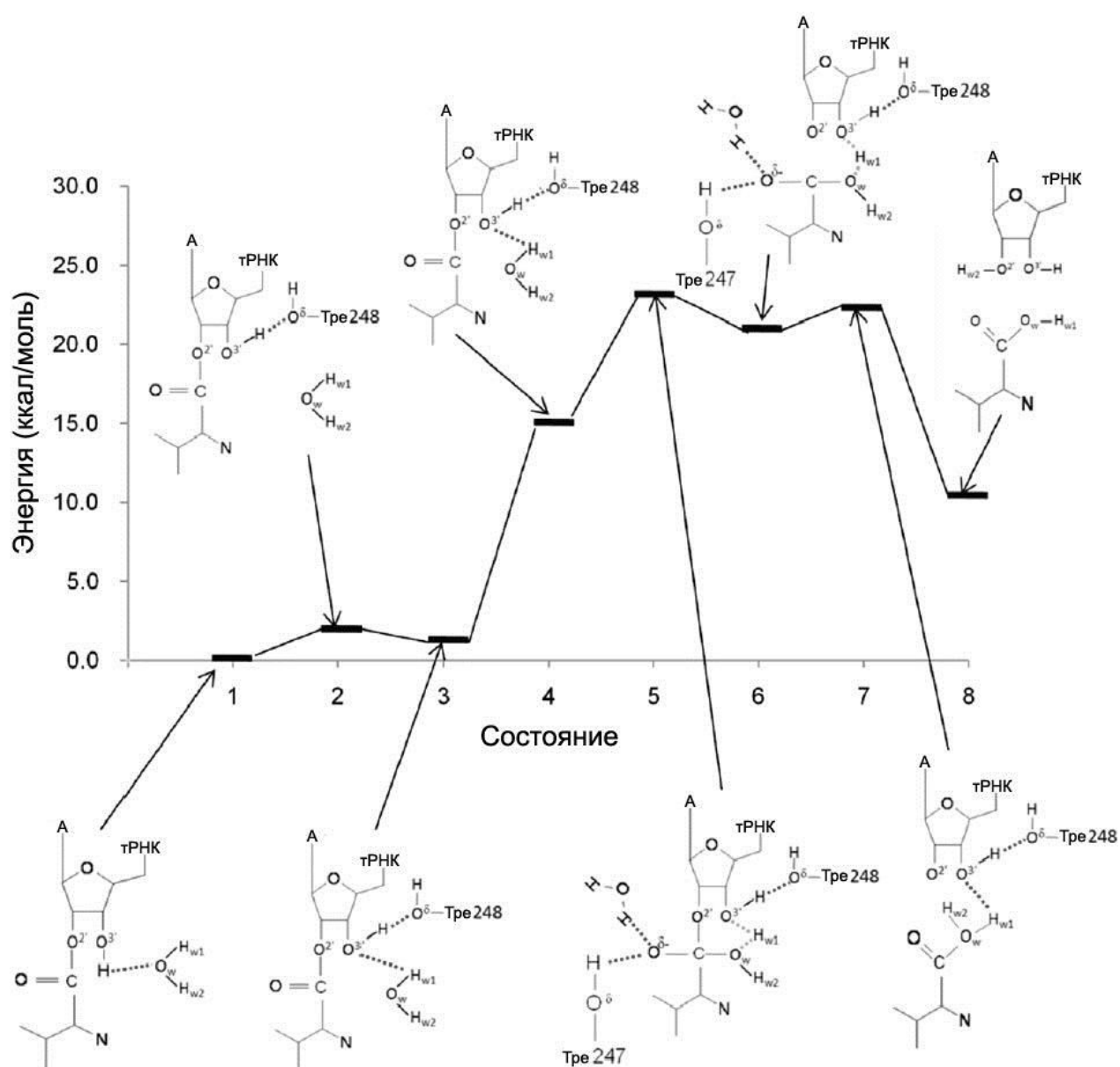


Рис. 1.4. Механизм посттрансферного редактирования ЛейРС *T. thermophilus*

ЛейРС различных организмов используют имеющиеся в наличии механизмы редактирования в различных соотношениях. Так, ЛейРС *E. coli* для предотвращения аминоацилирования тРНК^{Лей} изолейцином в основном использует посттрансферное редактирование, а дрожжевая – преимущественно претрансферное [66]. Это соотношение может меняться у одного и того же фермента в виде функциональной компенсации последствий мутагенеза [67].

1.2.2.4. МетРС. Метионил-тРНК синтетаза (МетРС) обладает претрансферным редактированием против гомоцистеина, который она способна активировать с относительной специфичностью 10^{-2} - 10^{-3} . При различии в сродстве к активному центру МетРС на два порядка (0,03 и 5,2 мМ соответственно, для *E. coli*), метионин и гомоцистеин активируются со сходной k_{cat} (93 и 87 с⁻¹). Расщепление гомоцистеинил-аденилата сопровождается взаимодействием сульфгидрильной и карбоксильной групп с образованием циклического тиолактона гомоцистеина [49; 48]. Показано превращение экзогенного гомоцистеина клетками *E. coli in vivo* [68]. Реакция циклизации остатка гомоцистеина катализируется по субстрат-ассистированному механизму, при участии его фосфатной группы в роли основания, либо с использованием в качестве основания остатка аспарагиновой кислоты [69].

Несмотря на наличие у МетРС укороченного домена CP1, гомологичного редактирующим доменам остальных трёх редактирующих АРС 1-го структурного класса, она лишена способности осуществлять посттрансферное редактирование. При этом CP1-домен МетРС, в отличие от своих гомологов, содержит цинк-связывающий пептид, участвующий в стабилизации переходного состояния при активации метионина [70].

1.2.3. Редактирование у АРС 2-го структурного класса. У АРС 2-го класса домены, ответственные за посттрансферное редактирование, разнородны по своей архитектуре. Гомологичны лишь редактирующие домены АлаРС и бактериальных ТреРС, причём, несмотря на это, механизмы редактирования у них различны [1]. Редактирующие домены ФенРС и ПроРС не имеют

гомологов у других APC, а редактирующая SerPC лишена редактирующего домена [71].

1.2.3.1. АлаРС. Аланил-тРНК синтетаза (АлаРС) нуждается в редактировании против глицина и серина. Существенно отличаясь от аланина по константам связывания (0,42, 58,5 и 54,8 мМ для аланина, глицина и серина соответственно), эти аминокислоты, тем не менее, при попадании в активный центр АлаРС, активируются с похожими каталитическими константами (2,4, 3,0 и 1,2 с⁻¹). Это даёт разницу в скоростях активации, оцениваемую в 100-300 раз [1]. Как показали структурные исследования, все три аминокислоты связываются в активном центре фермента практически одинаковым образом, а гидроксильная группа серина дополнительно взаимодействует с консервативным остатком аспарагиновой кислоты, связывающим аминокислотные остатки всех активируемых аминокислотных остатков [72].

АлаРС осуществляет посттрансферное редактирование против обеих аминокислот в активном центре редактирующего домена, расположенном вслед за основным каталитическим доменом, и гомологичного редактирующему домену ТреРС. Наибольшее влияние на редактирующую активность *in vitro* и *in vivo* оказывает замена консервативного остатка цистеина, что, наряду с другими данными, свидетельствует о различных механизмах гидролиза ошибочно синтезированных аминоацил-тРНК у АлаРС и ТреРС [1], причём для АлаРС этот механизм остаётся неизвестным. Редактирующий активный центр находится от синтетического активного центра на расстоянии более 35Å, что делает проблематичным перенос аминокислотного остатка между сайтами путём изменения конформации тРНК [73]. Это позволяет предположить вторичное связывание ошибочно синтезированных аминоацил-тРНК после диссоциации [74].

В редактирующем активном центре АлаРС *in vitro* Ser-тРНК^{Ала} деацилируется лишь в 12,2 раза быстрее, чем Ала-тРНК^{Ала} [75]. Это не мешает посттрансферному редактированию АлаРС оставаться

функционально важным для организма. Мыши, в клетках которых эта функция нарушена вследствие аминокислотной замены, страдают атаксией. У них наблюдается гибель клеток Пуркинье вследствие накопления неправильно уложенных глобулярных белков [76].

Помимо редактирующего домена, в поддержании специфичности АлаРС как у про-, так и у эукариот участвуют *in trans* гомологичные ему редактирующие белки AlaX [77; 42]. В узнавание серина в активном редактирующем центре как АлаРС [78], так и AlaX [79], вовлечён ион цинка. Выталкивание остатка аланина у АлаРС обеспечивается остатком глутамина, а у AlaX – соответствующим ему остатком треонина, осуществляющими химическое выталкивание его гидрофобной метильной группы [79].

1.2.3.2. ТреРС. Треонил-тРНК синтетаза (ТреРС) требует для активации аминокислот координирования гидроксильной группы боковой цепи [80], взаимодействующей с ионом Zn^{2+} в аминокацилирующем активном центре, и нуждается в редактировании против серина, связываемого пространственно очень сходным с треонином образом [33]. По скорости переноса аминокислотного остатка из аминокацил-аденилата на тРНК^{Тре} связавшийся с активным центром серин лишь незначительно уступает треонину. Различия в эффективности связывания серина и треонина дают общую разницу в скорости активации порядка 10^3 [81]. Редактирование серина ТреРС осуществляется как по претрансферному, так и по посттрансферному пути, в зависимости от доступности тРНК^{Тре}. Гидролиз серил-аденилата за счёт тРНК-независимого претрансферного редактирования идёт в 29 раз быстрее, чем для треонил-аденилата в тех же условиях, и в 40 раз быстрее, чем спонтанный гидролиз. Но при наличии тРНК^{Тре} в достаточной концентрации этот путь практически не используется, уступая место посттрансферному пути [82]. В посттрансферное редактирование вовлечён N-концевой домен ТреРС [80]. Редактирующий домен, присутствующий у бактерий и эукариот, лишён гомологии с

присутствующим у архей. Он гомологичен редактирующему домену АлаРС, в то время как археобактериальный редактирующий домен гомологичен деацилазам D-аминокислот [83]. Механизм катализа D-тирозил деацилазы будет ниже описан отдельно, поэтому здесь будет рассмотрена только работа редактирующего домена ТреРС бактериального типа. Несмотря на гомологию первичной структуры, механизмы редактирования различны для бактериальных ТреРС и АлаРС [1]. Перенос аминокислотного остатка из аминоацилирующего активного центра в редактирующий осуществляется за счёт изменения конформации ССА-конца тРНК [33]. Треонин не допускается в редактирующий активный центр ТреРС путём стерического исключения метильной группы. Углерод карбоксильной группы остатка серина подвергается нуклеофильной атаке скоординированной молекулы воды (рис. 1.5) [84]. Вторая молекула воды, также скоординированная в редактирующем активном центре, передаёт протон 3'-кислороду А76 тРНК^{Тре}. Протон атакующей молекулы воды стабилизируется остатком гистидина, а гидроксильная группа второй молекулы – солевым мостиком с остатком аспарагиновой кислоты [84].

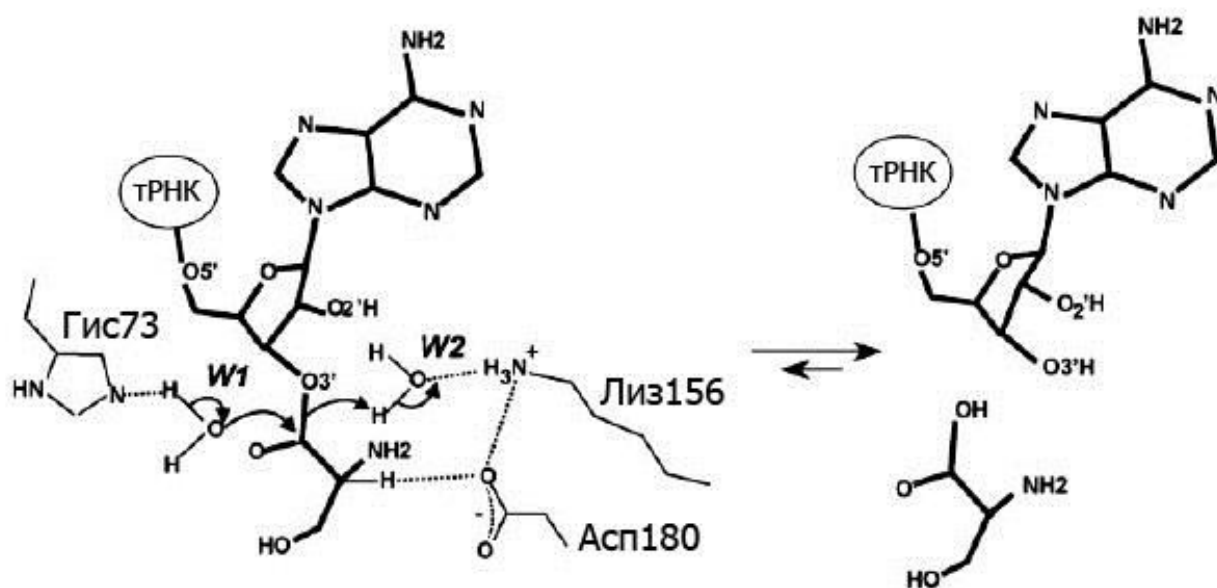


Рис. 1.5. Предложенный механизм гидролиза серил-тРНК^{Тре} ТреРС *E. coli*. Буквой W обозначены молекулы воды

Дрожжевая митохондриальная ТреРС лишена редактирующего домена и может полагаться только на претрансферное редактирование. При этом серин активируется ею примерно в 700 раз менее эффективно, чем треонин, что не позволяет удерживать количество ошибок на приемлемом уровне. Скорости претрансферного редактирования против серина и треонина различаются лишь приблизительно вчетверо, что свидетельствует о трудности различения их аденилатов ферментом. Значительная часть серил-АМФ уходит в раствор, что объясняется на два порядка более слабым связыванием по сравнению с треонил-АМФ. Сокристаллизация аналогов обоих аминоксил-аденилатов показала существенные отличия как в конформации белка и лиганда, так и в расположении скоординированной воды. В случае аналога серил-АМФ вода скоординирована аминокислотными остатками Лиз273 и, опосредованно, Тир109, под оптимальным углом для нуклеофильной атаки. В случае аналога треонил-АМФ ближайшая молекула воды оказывается связана с атомом кислорода сульфамойльной группы (аналогичной фосфатной), и ориентирована неоптимальным для нуклеофильной атаки образом [85].

1.2.3.3. ФенРС. Фенилаланил-тРНК синтетаза (ФенРС) характеризуется такими особенностями, как аминокислотирование по 2'-гидроксильной группе А76 тРНК (что является исключением для АРС 2-го структурного класса), и гетеродимерной четвертичной структурой (наряду с глицил-тРНК синтетазой) [11]. Этот фермент нуждается в редактировании против тирозина, идущем в основном по посттрансферному пути [86]. Бактериальные, археобактериальные и эукариотические ФенРС [87] включают специальный редактирующий домен [86], расположенный в В3/В4 участке β -субъединицы, и не проявляющий структурного сходства с редактирующими доменами других АРС [88]. Митохондриальные ФенРС лишены β -субъединицы, и редактирующий домен у них отсутствует [89].

Посттранскрипционное редактирование ФенРС осуществляется путём позиционирования аминокислотного остатка ошибочно аминоацилированной тРНК для гидролиза молекулами воды. С одной из этих молекул образует водородную связь 3'-гидроксильная группа А76 тРНК^{Фен}, вносящая наибольший вклад в обеспечение гидролиза Тир-тРНК^{Фен}. Скорость-лимитирующим процессом для посттранскрипционного редактирования ФенРС является связывание субстрата в редактирующем активном центре, а не собственно катализ [4]. На основании кристаллической структуры ФенРС *T. thermophilus* [88] и структурного моделирования её комплекса с тирозил-аденозином в растворе, было предложено участие в гидролизе Тир-тРНК^{Фен} двух молекул воды, одна из которых координируется как боковой цепью Тре354, так и 3'-ОН А76 тРНК^{Фен}. При этом в экспериментах с ФенРС *E. coli* эффект модификации 3'-д-А76 Тир-тРНК^{Фен} на соотношение k_{cat}/K_m реакции деацилирования составил около 300 раз, в то время как эффект замены Тре354 на валин составил 3,4 раза [4].

Авторы, опубликовавшие кристаллическую структуру ФенРС *T. thermophilus* в комплексе с аналогом фенилаланил-А76 пурамицином постулировали сходство конформации пурамицина, связанного в редактирующем активном центре ФенРС, с ортоэфиром, возникающим как промежуточное соединение при переацилировании между 2'- и 3'-О А76 [90]. Дополнив своё исследование квантово-механическим вычислительным моделированием возможных механизмов реакции деацилирования, они пришли к выводу о возможности ферментативного деацилирования как 2'-, так и 3'-региоизомеров Тир-тРНК^{Фен}, а также их переацилирования в обоих направлениях [90]. К сожалению, в работе схематически показаны только некоторые из постулированных реакций (рис. 1.6) [90]. При этом, налицо несхожесть представленных в ней результатов с результатами обсуждавшейся выше работы Линга и соавторов [4]. Так, атакующую молекулу воды при гидролизе 2'-региоизомера координирует другой остаток треонина, а боковая цепь Асн250 (нумерация ФенРС *T. thermophilus*), взаимодействует при этом

непосредственно с карбонильной группой субстрата [90], а не с молекулой растворителя [4].

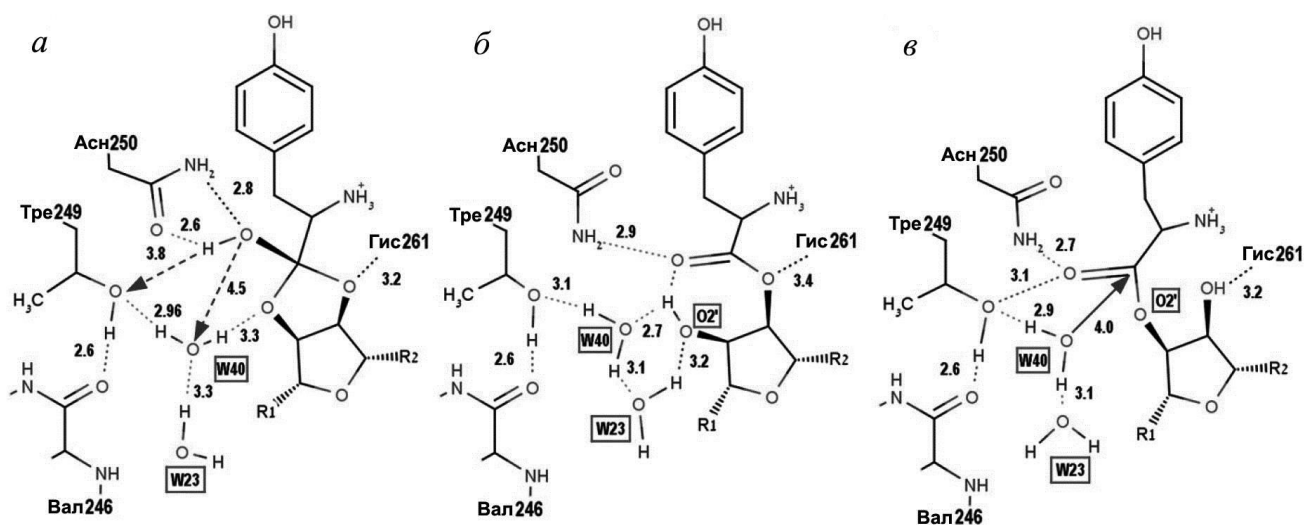


Рис. 1.6. Ортоэфир (а), 3'-региоизомер (б) и 2'-региоизомер (в) Тир-тРНК^{Фен} в редактирующем активном центре ФенРС *T. thermophilus*. R1 – остаток аденина, R2 – остаток тРНК^{Фен}. На рисунке а стрелками показаны возможные источники протона для превращения ортоэфира в 3'-региоизомер, на рисунке в – направление потенциальной атаки молекулы воды W40 по карбонильному углероду 2'-региоизомера

Часть синтезированных Тир-тРНК^{Фен} диссоциирует до редактирования, и связывается с Ef-Tu. Однако, ФенРС способна конкурировать с Ef-Tu за свой ошибочный продукт, таким образом возможность для вторичного связывания и эффективного редактирования остаётся [74]. Как известно, фактор элонгации Ef-Tu катализирует трансэтерификацию аминоксил-тРНК [91], аминокислотированных по 2'-кислороду, в их 3'-региоизомеры. Таким образом, способность редактирующего домена ФенРС к деацилированию обоих региоизомеров, и/или их переацилированию могла бы иметь определённые эволюционные причины. В то же время, вряд ли вызывает сомнения, что в типичном случае редактирующему активному центру предстоит связать Тир-

тРНК^{Фен} в том виде, в котором её 3'-конец покинул аминоацилирующий активный центр, то есть в виде 2'-региоизомера (рис. 1.6, в).

1.2.3.4. СерРС. Серил-тРНК синтетаза (СерРС) ошибочно активирует треонин (в одном случае из 2550) и цистеин (в одном случае из 3380), что теоретически не предъявляет жёстких требований к наличию функции редактирования. Тем не менее, фермент специфически гидролизует образованные им треонил- и цистеинил-аденилат путём тРНК-независимого претрансферного редактирования, происходящего непосредственно в аминоацилирующем активном центре [71]. Таким образом, лишённая редактирующего домена [22] СерРС, полностью обеспечивает синтез и редактирование продуктов, используя возможности своего единственного активного центра.

1.2.4. D-аминоацил деацилазы. Тирозил-, триптофанил- и аспартил-тРНК синтетазы (ТирРС, ТрпРС и АспРС) способны аминоацилировать тРНК D-аналогами узнаваемых ими аминокислот. Редактирование против них осуществляет *in trans* D-тирозил деацилаза, гомологичная редактирующему домену архебактериальных ТреРС. Активный центр D-тирозил деацилазы позволяет ей узнавать широкий спектр токсичных для клетки остатков D-аминокислот, включая D-Арг, D-Лиз, D-Глу, D-Сер и D-Гис, предотвращая их участие в белковом синтезе. При этом фермент обладает энантиоспецифичностью, и не гидролизует L-аминоацил-тРНК [92].

Кристаллическая структура D-тирозил деацилазы *Plasmodium falciparum* в комплексе с негидролизуемым аналогом субстрата продемонстрировала непосредственное узнавание белком хирального центра гидролизуемого аминокислотного остатка, что объясняет его широкую специфичность. На основании структурных данных и молекулярного моделирования был предложен механизм реакции деацилирования D-аминокислот, включающий активацию атакующей молекулы воды 2'-гидроксильной группой A76 субстрата. При этом аминокислотные участки фермента, как предполагается, непосредственного участия в катализе не принимают (рис. 1.7) [93].

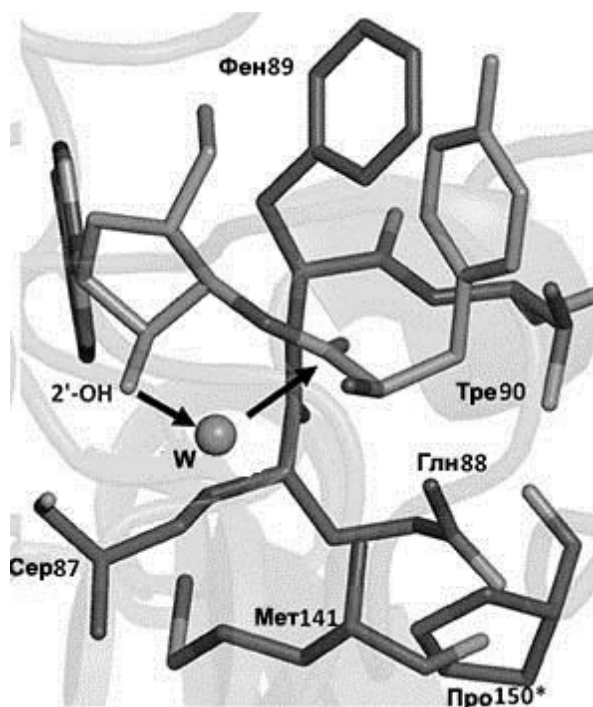


Рис. 1.7. Предполагаемый механизм гидролиза D-аминоацил-тРНК D-тирозил деацилазой *Plasmodium falciparum*. W – молекула воды

1.2.5. Характерные черты редактирующих механизмов.

Редактирующие механизмы APC, при всём своём разнообразии, позволяют выделить ряд характерных черт.

Современные данные свидетельствуют в пользу того, что претрансферное редактирование, по крайней мере, у большинства использующих его APC происходит непосредственно в аминокацилирующем активном центре [50; 94]. По всей видимости, этот механизм, не требующий вовлечения дополнительных редактирующих доменов, или действующих *in trans* деацилаз [35], является наиболее эволюционно ранним механизмом поддержания аминокислотной специфичности, за исключением узнавания аминокислот, предшествующего их активации. Несмотря на существующие предположения об участии в претрансферном редактировании механизма селективного выталкивания негидролизованых аминокацил-аденилатов в раствор с последующим их спонтанным гидролизом [49; 45], основным механизмом является их

ферментативный гидролиз [46; 50], видимо, за счёт большей скорости более надёжно обеспечивающий обезвреживание ошибочно активированных аминокислотных остатков до переноса на тРНК. При этом ферментативный механизм гидролиза ошибочно синтезированных аминоксил-аденилатов, как и механизм их распознавания, во всех случаях остаётся неизвестным.

При сосуществовании претрансферного и посттрансферного механизмов, их относительный вклад в поддержание аминокислотной специфичности определяется соотношением скорости гидролиза ошибочно синтезированных аминоксил-аденилатов и скорости переноса их аминокислотных остатков на тРНК [50]. Таким образом, на этом этапе эффективность работы фермента вступает в конфликт с его специфичностью, что может требовать введения дополнительного, посттрансферного этапа редактирования.

Посттрансферное редактирование происходит в активных центрах обособленных редактирующих доменов, либо гомологичных им действующих *in trans* деацилаз. При редактировании *in cis*, перенос аминокислотного остатка между аминокислицирующим и редактирующим активными центрами происходит при помощи изменения конформации ССА-конца тРНК. При этом спиральная конформация ССА-конца, характерная для свободной тРНК, соответствует для комплексов с АРС 1-го структурного класса взаимодействию с редактирующим СР1-доменом [38; 63], а для комплексов с АРС 2-го структурного класса – взаимодействию с аминокислицирующим активным центром [33; 52]. При редактировании *in trans* может требоваться формирование тройственного комплекса АРС: аминоксил-тРНК: деацилаза [95].

Для АРС и деацилаз, механизмы посттрансферного редактирования которых изучены в наибольшей степени – ЛейРС [64], ТреРС [84], ФенРС [4; 90] и ПроРС [2] прослеживается позиционирование вблизи гидролизуемой связи скоординированных аминокислотными остатками редактирующего активного центра молекул воды, очевидно, вовлечённых в гидролиз. В координировании молекул растворителя участвуют 3'-ОН (для ЛейРС и ФенРС)

или 2'-ОН (для ТреРС, ПроРС и D-тирозил деацилазы [93]) A76 ошибочно аминоацилированной тРНК. Существующая модель катализа деацилирования Сер-тРНК^{Тре} отводит её 2'-ОН роль в переносе протона [84]. В посттрансферном редактировании ЛейРС 3'-ОН, согласно компьютерным расчётам, активирует молекулу воды для гидролиза [53]. Показана ведущая роль аналогичной ОН-группы и в посттрансферном редактировании ФенРС 2-го класса [4]. Таким образом, участие ОН-групп A76 ошибочно аминоацилированной тРНК можно считать характерной чертой механизмов посттрансферного редактирования, а происходящую при этом реакцию – субстрат-ассистированной. Интересно, что гидроксильные группы тРНК принимают участие также в спонтанном переаминоацилировании и деацилировании аминоацил-тРНК, в катализе формирования пептидной связи при трансляции на рибосоме [96; 97].

Следует подчеркнуть, что все приведённые выше наблюдения носят сугубо предварительный характер, по причине малой изученности механизмов редактирования многих редактирующих АРС. Как было показано выше, даже АРС, обладающие гомологичными редактирующими доменами, могут демонстрировать существенные различия в механизмах их функционирования. Тем менее уверенно можно проводить параллели с наименее изученными редактирующими АРС, в числе которых остаётся пролил-тРНК синтетаза (ПроРС).

1.3. Особенности пролил-тРНК синтетазы

ПроРС относится к подклассу А второго структурного класса, и представляет собой гомодимер, мономер которого состоит из двух основных доменов – аминоацилирующего и С-концевого антикодон-связывающего, характерного для АРС этого подкласса. У архей и эукариот также имеется примыкающий к антикодон-связывающему дополнительный С-концевой домен. Для эукариот характерны и N-концевые удлинения различной природы [52]. У бактериальных ПроРС между вторым и третьим консервативными

характеристическими мотивами 2-го структурного класса в первичную структуру аминокцилирующего домена вставлена последовательность редактирующего INS (insertion) домена [98]. Исключение составляют α -протеобактериальные и митохондриальные ПроРС, у которых редактирующий домен практически полностью вторично делетирован. Кроме того, у многих бактерий, относящихся к самым различным таксонам, типичная бактериальная ПроРС заменена гомологичной архейным и эукариотическим ферментам. В эволюции бактерий она появилась предположительно в результате раннего горизонтального переноса, и в некоторых случаях её ген сосуществует в клетке с геном собственно бактериальной ПроРС. Такая разновидность фермента лишена редактирующего домена. Напротив, у дрожжей и некоторых паразитических простейших домен, гомологичный редактирующему домену бактерий, находится на N-конце ПроРС эукариотического типа [52]. Существуют также обособленные белки-деацилазы, гомологичные редактирующему домену ПроРС – YbaK [36; 99], ProX [37] и PrdX [35].

1.3.1. Проблема редактирования пролил-тРНК синтетазой. ПроРС ошибочно активировывает аланин и цистеин. Если константа Михаэлиса для пролина у различных ПроРС варьирует в пределах, 0,05 – 0,28 мМ, то для цистеина – в пределах 0,01 – 0,26 мМ. В большей степени различаются каталитические константы: 5,6 – 63 с⁻¹ для пролина и 0,03 – 0,39 с⁻¹ для цистеина. Вероятность активации цистеина варьирует в широких пределах от 1/31 до 1/1428 [100]. Для активации аланина константа Михаэлиса находится в районе 140 мМ, а константа скорости 1,7 с⁻¹. Вероятность активации аланина составляет $3,6 \cdot 10^{-5}$ ($\approx 1/28000$) [45]. При этом концентрация аланина в клетке *E. coli* более чем в 18 раз превышает концентрацию пролина, а концентрация цистеина – в 5 раз [101], что в случае с аланином создаёт, а в случае с цистеином усугубляет опасность недопустимого уровня ошибок. Концентрация аланина несколько возрастает в ходе инкубации культуры. Более значительный рост концентрации аланина

в клетках наблюдается при недостатке кислорода [102]. Различия в соотношении концентраций аминокислот в цитоплазме клеток различных организмов может влиять на требования к редактирующим функциям ПроРС.

Способность эффективно активировать цистеин, и вместе с тем неспособность эффективно редактировать против него *in cis* [103] ранее вызывали предположения о двойной специфичности ПроРС, то есть способности синтезировать как пролил-тРНК^{Про}, так и цистеинил-тРНК^{Цис} [104; 105; 106]. Однако, позже было показано, что фермент аминоацилирует цистеином только тРНК^{Про}. Предполагается, что решающую роль в редактировании против цистеина играет действующий *in trans* обособленный белок, гомолог редактирующего домена ПроРС, YbaK, образующий для этого тройственный комплекс с ПроРС и цистеинил-тРНК^{Про} [95]. Квантово-механическое моделирование осуществляемой YbaK реакции деацилирования позволило указать на циклизацию цистеина, как ключевой элемент её механизма (рис. 1.8). При этом основная цепь белка стабилизирует переходное состояние во время реакции, а 2'-ОН A76 тРНК^{Про} стабилизирует её продукт [3]. Следует отметить, что у архебактерий и эукариот деацилаза YbaK отсутствует, за исключением архебактерии *Aeropyrum pernix* [52].

Другой гомологичный белок, ProX, способен деацилировать аланил-тРНК^{Про} [37]. Он отсутствует только в клетках архебактерий [52]. Помимо ProX, действительный вклад которого в специфичность ПроРС ясен не вполне, в редактировании против аланина задействованы механизмы работающие *in cis*. ПроРС обладает как претрансферным редактированием против аланина, происходящим в аминоацилирующем активном центре, так и посттрансферным редактированием, происходящим в редактирующем INS-домене [103; 98].

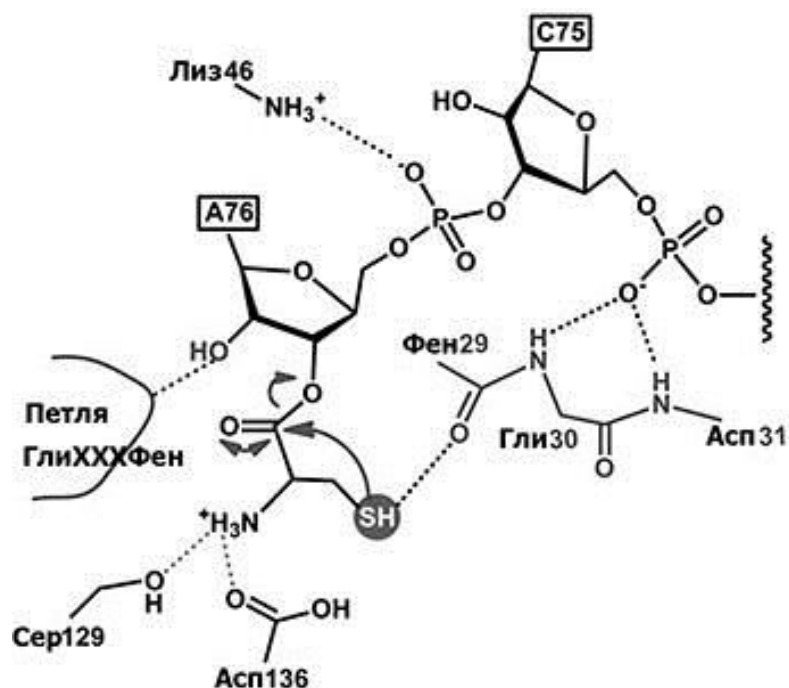


Рис. 1.8 Механизм гидролиза цистеинил-тРНК^{Про} деацилазой YbaK *E. coli*

Изученные третичные структуры ПроРС эубактерии *E. faecalis* (ПроРС_{Ef}) и комплекса ТреРС *E. coli* с тРНК^{Тре} позволили создать компьютерную модель комплекса ПроРС_{Ef} с пролил-тРНК^{Про} в конформациях как аминоацилирования, так и редактирования. Предположения о локализации активного центра редактирующего домена ПроРС для этой цели позволили сделать анализ первичной структуры редактирующих доменов и свободных деацилаз [52], а также сайт-направленный мутагенез редактирующего домена ПроРС *E. coli* (ПроРС_{Ec}) [107]. Перемещение редактируемого аминокислотного остатка между аминоацилирующим и редактирующим активными центрами в этой модели требует лишь изменения конформации 73-АССА-76 3'-концевого одноцепочечного участка аминоксил-тРНК. Предполагаемый редактирующий активный центр содержит абсолютно консервативный остаток Лиз279 (здесь и далее нумерация ПроРС_{Ef}), взаимодействующий с А76 тРНК, консервативные остатки Гис366, Гли331, Иле333 [52].

Сайт-направленный мутагенез ПроРС_{Ec} показал ведущую роль аминокислотного остатка Лиз279 в посттрансферном редактировании [46]. Он

обеспечивает связывание ССА-конца аланил-тРНК^{Pro} в редактирующем активном центре и её позиционирование для гидролиза [149]. Замена остатка Лиз279 на аланин практически полностью подавляет деацилирование аланил-тРНК^{Pro}, и делает фермент способным синтезировать её в определяемых количествах. Такая форма фермента характеризуется способностью к дискриминации пролина и аланина с надёжностью 1900 к 1 ($5 \cdot 10^{-4}$) [46], что близко к верхней границе теоретического нормального уровня (10^{-4} - 10^{-5}). Но в условиях цитоплазмы *E. coli*, где концентрация аланина в 18 раз выше, чем концентрация пролина [101], надёжность дискриминации будет около 105 к 1 ($0,9 \cdot 10^{-2}$). Таким образом, одно лишь претрансферное редактирование ПроРС не способно обеспечить необходимую аминокислотную специфичность.

В ПроРС*Ec* боковая метильная группа остатка аланина располагается в гидрофобном кармане предполагаемого редактирующего домена, образованном консервативными аминокислотными остатками Иле263, Лей266, Лиз279 и частично консервативным Тре277. Сайт-направленный мутагенез этих остатков приводит к снижению посттрансферной редактирующей активности. Также изменение размеров кармана нарушает специфичность процесса [109]. Согласно построенной квантово-механической модели реакции деацилирования аланил-тРНК^{Pro} ПроРС*Ef*, 2'-ОН группа А76 тРНК активирует молекулу воды для гидролиза ангидридной связи, и может участвовать в переносе протона [2] (рис. 1.9).

Необходимо заметить, что о претрансферном редактировании в настоящее время известно значительно меньше, чем о посттрансферном. Показано, что претрансферное редактирование против аланина происходит непосредственно в аминоацилирующем активном центре. Эксперименты с ферментом *E. coli* свидетельствуют в пользу тРНК-независимости этого процесса. Гидролиз аланил-аденилата осуществляется ферментативным путём [46], но механизмы его распознавания и катализа реакции остаются неизвестными.

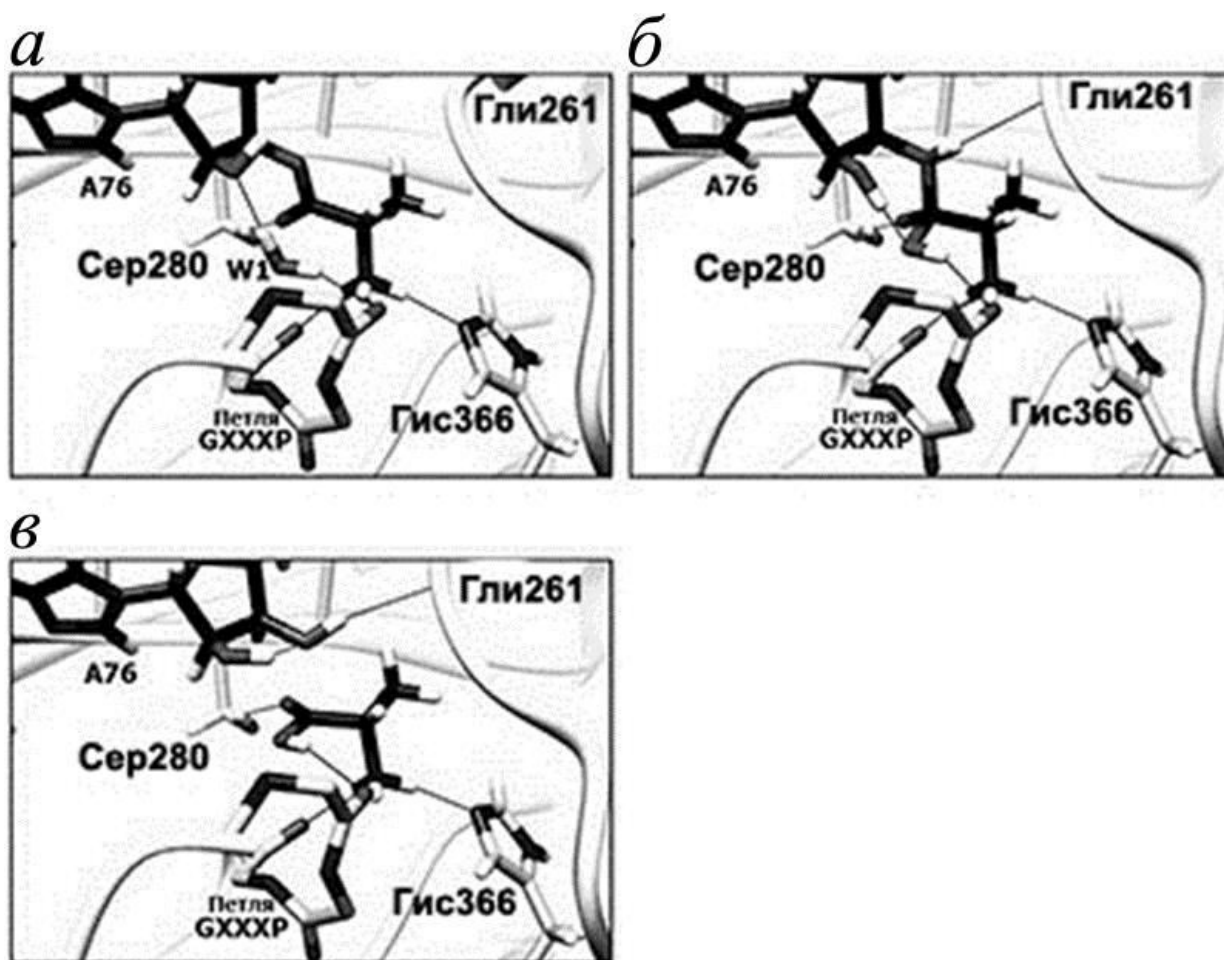


Рис. 1.9 Предложенный механизм гидролиза аланил-тРНК^{Про} в редактирующем домене ПроPSEf. *а* – Пре-реакционный комплекс. Молекула воды (W1) активируется 2'-гидроксильной группой A76 аланил-тРНК^{Про}. *б* – Переходное состояние. Протон с молекулы воды переносится через 2'-ОН на 3'-О. *в* – Оксианионное промежуточное соединение стабилизируется взаимодействием с боковой цепью Сер280. Формируются продукты реакции

Филогенетическое разнообразие ПроРС, а также малоизученность молекулярных механизмов поддержания её аминокислотной специфичности делают данный фермент первоочередным объектом исследований в области энзимологии белкового синтеза.

РАЗДЕЛ 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Материалы и оборудование

В работе были использованы компоненты сред для бактериальных культур фирмы «Difco», соли и компоненты буферных растворов квалификации «ос.ч.», мономеры для приготовления полиакриламидных гелей (ПААГ) фирмы «Reanal», агароза фирмы «Q-BIOgen», ферменты фирмы «Roche», диэтиламиноэтил-сефароза (ДЭАЭ-сефароза) фирмы «Pharmacia Biotech», сорбент ДЭАЭ Toyopearl 650M фирмы «Тоуо Soda», колонка для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) ProSwift Monolith WAX-1S фирмы «Dionex», радиоактивно-меченые вещества фирмы «Amersham», стекловолоконные фильтры фирмы «Whatman».

2.2. Плазмиды и штаммы

В работе были использованы клетки *E. coli* штамма DH5 α (F- ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR, recA1 endA1 hsdR17(rk- mk+ phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1) фирмы "Thermo Fisher Scientific"; TOP10 (F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ -) фирмы "Invitrogen"; BL21 (DE3) Star (F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3)) фирмы "Invitrogen", JM101 (supE, thi, Δ (lac-proAB), [F' traD36, proAB, lacIqZ Δ M15]) фирмы "Agilent Technologies".

2.3. Методы работы с клетками *E. coli*

2.3.1. Питательные среды для роста бактериальных клеток. Среда Лурия-Бертани применялась при выращивании культур предназначенных для выделения плазмидных ДНК. Она содержала 10 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl. Агаризованная среда Лурия-Бертани, предназначавшаяся для заливки в чашки Петри, содержала агар в концентрации 15 г/л. Для экспрессии тРНК *in vivo* применялась среда 2xTY. Она содержала 16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта и 5 г/л NaCl. Калий-фосфатная среда применялась для наращивания биомасс с целью экспрессии в них рекомбинантных белков. Эта среда содержала 5,6 г/л KH_2PO_4 , 28,9 г/л K_2HPO_4 , 10 г/л дрожжевого экстракта и 40 мМ глюкозу. Все среды стерилизовали автоклавированием при 1,5 атм в течение 40 мин, глюкозу стерилизовали фильтрованием и добавляли к охлаждённой стерильной среде. Среда SOB для получения химически компетентных клеток *E. coli* содержала 20 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl. Среда SOC, используемая при электротрансформации *E. coli* содержала 20 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 20 мМ глюкозу, 10 мМ MgCl_2 , 10 мМ MgSO_4 . Антибиотики добавляли из стоковых растворов концентрацией 200 мг/мл для ампициллина и 50 мг/мл для канамицина. Рабочая концентрация ампициллина составляла 100 мкг/мл, канамицина – 50 мкг/мл.

2.3.2. Получение компетентных клеток *E. coli*. Для трансформации препаратами плазмидных ДНК применяли химически компетентные клетки. Для их приготовления культуру наращивали в среде SOB до средней lag фазы, охлаждали на льду и осаждали на холоду (4 °C) в течение 20 мин при 3000 об/мин. Центрифугирование повторяли для полного удаления супернатанта. Полученный осадок суспендировали в буферном растворе, содержащем 10 мМ пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновую кислоту) (PIPES)-KOH, pH 6,7, 55 мМ MnCl_2 , 15 мМ CaCl_2 и 250 мМ KCl, из расчёта 25 мл раствора на каждые 100 мл

культуры. После 15 мин инкубации суспензии клеток на льду осаждение повторяли. Вновь полученный осадок суспендировали в том же растворе, дополнительно содержащем 3,5% диметилсульфоксид (ДМСО), из расчёта 5 мл на 100 мл исходной культуры. После 15 мин инкубации на льду концентрацию ДМСО доводили до 7% и инкубацию повторяли. Аликвоты суспензии объёмом по 100 мкл замораживали и хранили при -70°C .

Для трансформации плазмидными ДНК, находящимися в лигазных и смесях для полимеразной цепной реакции (ПЦР-смесях), применяли электрокомпетентные клетки. Для их приготовления культуру наращивали в среде Лурия-Бертани до средней lag фазы, охлаждали на льду и осаждали на холоду (4°C) при 5000 g в течение 15 мин. Центрифугирование повторяли до полного удаления супернатанта. Полученный осадок суспендировали в охлаждённом до 0°C 10% глицерине: сначала в объёме равном изначальному объёму культуры, затем, после повторного центрифугирования во вдвое меньшем объёме, затем таким же образом объём ещё дважды уменьшали в 10 раз. Полученную в итоге суспензию электрокомпетентных клеток фасовали по 40 мкл, замораживали и хранили при -70°C .

2.3.3. Трансформация бактериальных клеток. Для химической трансформации бактериальных клеток фасовку химически компетентных клеток размораживали на льду, к ним добавляли β -меркаптоэтанол до концентрации 20 mM и 2 мкл раствора плазмидной ДНК при осторожном перемешивании. После 30 мин инкубации суспензию нагревали на водяной бане при 42°C в течение 30 с и затем в течение 2 мин охлаждали на льду. Далее трансформантов инкубировали в течение 1 ч при 37°C и интенсивном встряхивании в 400 мкл среды SOC и высевали на чашку Петри, содержащую агаризованную среду с соответствующим антибиотиком.

Для электротрансформации фасовку электрокомпетентных клеток, находящуюся на льду, смешивали с 2 мкл плазмидной ДНК в низкосолевого раствора (10 mM трис-HCl, pH=8,0) и инкубировали в течение 1 мин. Затем суспензию клеток переносили в предварительно охлаждённую до 0°C кювету

для электропорации. Электропорация осуществлялась при помощи прибора MicroPulser 165-2100 фирмы «Bio-Rad». После импульса напряжением 1,8 кВ клетки переносили в среду SOC объёмом 200 мкл, инкубировали 1 час при 37 °С и высевали на чашку Петри содержащую агаризованную среду с соответствующим антибиотиком.

2.3.4. Нарращивание биомассы *E. coli* и индукция экспрессии белка.

Колонию клеток с чашки Петри инокулировали в 10 мл калий-фосфатной среды, содержащей соответствующий антибиотик. Культуру наращивали 12-16 ч (ночь) при 37 °С и интенсивном перемешивании. Затем в предварительно прогретую калий-фосфатную среду с антибиотиком вносили 1/500 объёма ночной культуры. Инкубацию при 37 °С и интенсивном перемешивании продолжали до достижения OD_{600} 0,6-0,8 о.е.. Затем добавляли изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до концентрации 1 мМ и продолжали инкубацию в течение ещё 3,5 ч. По их истечении полученную биомассу охлаждали на льду в течение 15-30 мин и осаждали на холоду (4 °С) при 5000 g в течение 20 мин, а затем замораживали при -20 °С.

2.4. Методы работы с нуклеиновыми кислотами

2.4.1. Дизайн олигонуклеотидов. Последовательности частично комплементарных олигонуклеотидов для получения генов тРНК^{Про} *E. faecalis* (тРНК^{Про}*Ef*) и тРНК^{ПроАла}*Ef* подбирали на основе первичной структуры соответствующей тРНК с добавлением последовательностей промотора фага T7 и сайта рестрикции BstNI для обеспечения правильной терминации транскрипции. В случае тРНК^{Про}*Ef* учитывали последовательность цис-гидролитического рибозима. Температуру плавления олигонуклеотидов рассчитывали on-line при помощи сервиса Oligonucleotide Properties Calculator (<http://simgene.com>).

Последовательности олигонуклеотидов для сайт-направленного мутагенеза подбирали исходя из последовательности мутируемого гена и

характера необходимой мутации. Они были комплементарны двум цепям одного и того же участка гена. Длина олигонуклеотидов составляла 30-45 нуклеотидов. Она подбиралась таким образом, чтобы температура плавления олигонуклеотидов составляла не менее 78 °С. Для расчёта температуры плавления применялась следующая формула: $T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \% \text{неспаренных}$ (метод QuickChange, Stratagene), где %GC – процентная доля гуанина и цитозина в последовательности олигонуклеотида, N – его длина (число нуклеотидов), %неспаренных – процентная доля в олигонуклеотиде звеньев, некомплементарных матрице, наличие которых и ведёт к нуклеотидным заменам в продукте ПЦР. Некомплементарные матрице нуклеотиды вводили в центральную часть последовательности праймера. Как правило, олигонуклеотиды включали не менее 40% G и C, а также содержали один или несколько G и C на концах.

2.4.2. Амплификация ДНК с помощью полимеразной цепной реакции. Полимеразную цепную реакцию проводили для амплификации конструкции, содержащей ген ПроРС при сайт-направленном мутагенезе. В обоих случаях применялась редактирующая ДНК-полимераза Pfu (Stratagene) в концентрации 0,02 U/мкл и прилагающийся к ней 10-кратный фирменный буферный раствор. Объём реакционной смеси составлял 50 мкл, концентрации dNTP 0,5 mM каждого, 1 нг/мкл матрицы. 0,5 мкМ каждого из праймеров. Для реакции использовался амплификатор Techne фирмы TechGene. ДНК-матрицу денатурировали при 94 °С в течение 5 мин, затем следовало 16-30 циклов, включавших плавление, отжиг праймеров и синтез новых цепей ДНК при 72 °С. Временные параметры циклов варьировали в зависимости от длины амплифицируемой вставки, а температуру отжига от температуры плавления праймеров. За последним циклом следовала инкубация при 72 °С в течение 5 мин для завершения полимеризации фрагментов вставки.

2.4.3. Сайт-направленный мутагенез. Сайт-направленный мутагенез проводили по методу QuickChange® фирмы Stratagene (США) с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для этого плавил плазмиду pQE70,

содержащую мутируемый ген, и отжигали на обеих её цепях олигонуклеотиды с требуемыми одно- или двухнуклеотидными заменами. Используя высокопроцессивную ДНК-полимеразу Pfu-Turbo, обладающую 3'-5' редактирующей активностью, но лишённую 5'-3' редактирующей активности, получали две цепи мутантной плазмидной ДНК. Её количество наращивалось в ходе шестнадцати циклов ПЦР. Метилированную матрицу, не несущую мутаций, расщепляли рестриктазой DpnI, узнающей метилированные сайты Gm6A^TC. Полученной смесью трансформировали методом электропорации электрокомпетентные клетки *E. coli* DH5 α . Затем трансформированные клетки высевали на чашку Петри, содержащую агаризованую среду с соответствующим антибиотиком. Отбирали 8-10 колоний клеток с последующим наращиванием культур и выделением плазмидной ДНК. Наличие и целостность соответствующего гена в плазмидной ДНК проверяли рестриктным анализом. Мутированные гены проверяли методом секвенирования в группе секвенирования ИМБиГ.

2.4.4. Электрофорез и очистка фрагментов ДНК из геля.

Относительная электрофоретическая подвижность молекул ДНК в агарозном геле зависит от их молекулярной массы и концентрации геля. В зависимости от задачи использовались концентрации от 0,8 до 1,5 %. Для выделения вставки, содержащей ген tРНК^{Pro} была выбрана концентрация агарозного геля 1,5 %. Соответствующее количество сухой агарозы добавляли в буферный раствор TBE и нагревали до плавления. Заливка геля в форму производилась при температуре около 50 °С. Агарозный гель формировался на протяжении 20-25 мин при комнатной температуре. Пробы содержали буферный раствор TBE, краситель бромфеноловый синий и сахарозу до 40% для увеличения плотности. Для разгонки проб использовали прибор SE-1 фирмы «Хеликон». При введении проб в гель напряжение составляло 80 В, при разгонке – 160 В. Окрашивание гелей производили после разгонки в растворе бромистого этидия концентрацией 0,5 мкг/мл в течение 10 мин, с последующей отмывкой в воде также в течение 10 мин. Электрофореграммы визуализировались в проходящем

длинноволновом ультрафиолетовом свете, и документировались фотографированием. Для клонирования вставки, содержащей ген тРНК, содержащий её фрагмент геля был вырезан, ДНК была очищена при помощи набора Gel Extraction Kit фирмы “Quiagen” (Нидерланды). Принцип метода основан на сорбции ДНК на мембране, содержащей SiO₂.

2.4.5. Рестрикция и лигирование фрагментов ДНК. В работе применялись рестриктазы EcoRI, PstI, SacII, BamHI, BstNI фирмы “Fermentas” в концентрации 0,25 U/мкл с соответствующими фирменными буферными растворами. Реакцию продолжали в течение 2 ч при 37 °С, за исключением смесей, содержащих BstNI, которые инкубировали в течение 3,5 ч при 60 °С. Полноту прохождения реакции проверяли при помощи электрофореза в агарозном геле. Лигирование проводили в объёме 20 мкл в присутствии 0,15 U/мкл лигазы фага T4 фирмы “Fermentas”, соответствующего фирменного буферного раствора, 0,75 мМ АТФ, 0,75 мМ спермидина, при молярном соотношении вектора к вставке близком к 1/3. Реакцию проводили в течение 12-16 ч при 12 °С.

2.4.6. Выделение плазмидной ДНК. Плазмидную ДНК выделяли из клеток *E. coli* DH5α с помощью набора Qiagen Plasmid Purification Kit фирмы “Qiagen” (Нидерланды). Это модификация метода щелочного лизиса [110] с последующим связыванием ДНК с анионообменным носителем в низкосолевогом растворе. Осадок культуры клеток в поздней lag фазе (12-16 часов культивирования), содержащей соответствующую плазмидную ДНК суспендировали в буфере «1» (50 мМ трис-HCl, pH 8,0, 10 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), 100 мкг/мл РНКазы А), а затем лизировали добавлением раствора «2» (200 мМ NaOH, 1% додецилсульфат натрия (ДСН)). После 5 мин инкубации при комнатной температуре лизат нейтрализовали равным объёмом раствора «3» (3 М KAc, pH 5,5). Образовавшийся осадок и нерастворимую фракцию лизата удаляли центрифугированием при 12000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант наносили на ионообменный носитель центрифужных микроколонок путём

центрифугирования 1 мин при 12000 об/мин. Также путём центрифугирования колонку промывали буфером для промывки (50 мМ 3-[N-морфолино]пропансульфоновая кислота (MOPS), pH 7,0, 1 М NaCl, 15% изопропанол). Плазмидную ДНК элюировали буфером для элюции, содержащим 10 мМ Трис-НСl, pH 8,0.

2.4.7. Синтез РНК *in vitro*. Плазмидную ДНК нарабатывали в клетках *E. coli* штамма DH5 α , наращивая несущую плазмиду культуру в течение ночи при 37°C и постоянном перемешивании. Затем плазмидную ДНК выделяли по методу Бирнбойма [110], и рестрицировали по сайту BstNI в течение 3,5 ч при +60°C, что обеспечивает правильную терминацию транскрипции 3'-конца синтезируемой РНК. Рестрицированную ДНК очищали фенолом, хлороформом и переосаждением. Для этого к одному объёму раствора ДНК добавляли один объём фенола, насыщенного водным раствором 10 мМ трис-НСl, pH 8,0, перемешивали до состояния эмульсии, и центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин на охлаждённом до 4 °С роторе до разделения фаз. Затем отбирали водную фазу и добавляли к ней равный объём хлороформа, вновь перемешивали и центрифугировали в тех же условиях. К полученной водной фазе на льду добавляли два с половиной объёма 96% этанола $t = -20$ °С, встряхивали смесь в руках, и инкубировали 1 час при -20 °С. Затем смесь центрифугировали на роторе, охлаждённом до 4 °С в течение 10 мин при 12000 об/мин, удаляли супернатант, добавляли 20-30 мкл 70% этанола и центрифугировали 5 мин в тех же условиях. Удалив супернатант, осадок высушивали под вакуумным насосом в течение 5 мин и растворяли в 10 мМ трис-НСl, pH 8,0. Транскрипцию РНК-полимеразой фага Т7 проводили *in vitro* в реакционной смеси, содержащей 100 мМ трис-НСl, pH 8,0, 30 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреитол (ДТТ), 50 мМ спермидин и по 4 мМ АТФ, УТФ, ГТФ и ЦТФ, при концентрации ДНК-матрицы 0,5 мкМ в объёмах от 1 до 8 мл. Температуру реакционной смеси +37°C в течение 4-5 ч поддерживали при помощи водяной бани.

2.4.8. Разрезание транскрипта и очистка тРНК. Полученный транскрипт очищали на колонке DEAE-Toyopearl 650M, объём сорбента 1 мл. При этом осветлённую центрифугированием в течение 10 мин при 10000 об/мин реакцию смесь разводили в 20 раз буферным раствором, содержащим 10 мМ трис-НСl, рН 8,0 и 10 мМ MgCl₂, наносили на колонку и после промывки 40 мл того же раствора, элюировали в присутствии 1 М NaCl, 10 мМ трис-НСl, рН 8,0 и 10 мМ MgCl₂. Полученный элюат осаждали тремя объёмами 96% этанола температурой -20 °С в течение суток, затем смесь центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 мин при 4 °С. Отщепление цис-гидролитического рибозима стимулировали, подвергая РНК циклическому плавлению и отжигу в ПЦР-термоциклере в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис-НСl, рН 7,5 и 30 мМ MgCl₂, при концентрации транскрипта 4 мкг/мл. Программа ПЦР-термоциклера включала 14 циклов нагревания до 95 °С в течение 30 с и охлаждения до 60 °С за 9 мин. Затем транскрипт вновь плавил нагреванием при 70 °С в течение 3 мин и ренатурировали постепенным охлаждением в объёме воды, остывающей с 70 °С до комнатной температуры в течение часа. Очистку полученной тРНК от отщепившегося рибозима проводили с использованием ВЭЖХ на колонке ProSwift Monolith WAX-1S (ДЭАЭ-полиметакрилат) объёмом 0,73 мл при температуре 57 °С и скорости подачи растворов 1 мл/мин. На колонку наносили по 250 мкг транскрипта в буферном растворе, содержащем 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 4 мМ MgCl₂, 10% изопропанол. тРНК элюировали градиентом от 0,2 до 1 М NaCl в том же буфере.

2.4.9. Выделение тРНК из клеток-продуцентов. Генноинженерная конструкция для экспрессии тРНК^{Pro} *R. palustris* (CGG) любезно предоставлена Thibaut Crepin и Stephen Cusack, Гренобльское отделение ЕМБЛ, Франция. Нарращивание биомассы бактерий штамма *E. coli JM101*, содержащих ген тРНК, проводили при 37 °С в течение 17 часов в 4,0 литрах питательной среды 2xTY, содержащей 150 мг/л ампициллина. Выращенную культуру охлаждали, клетки собирали центрифугированием при 6000 об/мин в течение 15 мин и

ресуспендировали в трёх объёмах 5 мМ трис-НСl, рН 7,4 и 10 мМ ацетата магния. Клетки разрушали, добавляя к суспензии равный объём фенола, насыщенного 10 мМ натрий-ацетатным буферным раствором, рН 6,0 при комнатной температуре. Полученный лизат центрифугировали 30 мин при 14000 об/мин при 15 °С. К водной фазе добавляли NaCl до концентрации 0,5 М и осаждали тремя объёмами этанола. Смесь центрифугировали в течение 15 мин при 10000 об/мин. Высушенный на воздухе осадок растворяли в 5 мл 1,0 М NaCl и центрифугировали 30 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре. тРНК вновь осаждали этанолом в присутствии 0,5 М NaCl. Деацилирование тРНК проводили в 2 мл 1,8 М трис-НСl, рН 8,0 в течение 90 мин при 37 °С. После осаждения тремя объёмами этанола тРНК растворяли в 10 мл буферного раствора, содержащего 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 8 мМ MgCl₂ и 0,2 М NaCl. Полученный раствор наносили на колонку объёмом 14 мл с анионообменным носителем Toyopearl 650M, уравновешенную тем же буфером, и отмывали 0,3 М NaCl. тРНК элюировали 1М NaCl и вновь осаждали тремя объёмами этанола. Дальнейшую очистку тРНК^{Про} проводили с использованием хроматографа высокого давления HPLC GoldSystem на колонке Spherogel TSK DEAE 5PW объёмом 30 мл в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 8 мМ MgCl₂, 0,2 М NaCl, 10% изопропанол, тРНК элюировали градиентом 0 - 1,0 М NaCl в том же буфере. На колонку при этом наносили около 10 мг тРНК в объёме 10 мл. Фракции, содержащие тРНК^{Про} определяли по уровню акцепторной активности в реакции аминокислотирования, объединяли, осаждали тремя объёмами этанола, центрифугировали в течение 15 мин при 10000 об/мин, высушивали на воздухе и растворяли в 50 мМ ацетате аммония, рН 5,2, 10 мМ MgCl₂. Далее тРНК очищали на хроматографе UltiMate 3000 с использованием обращённо-фазовой хроматографической колонки Vydac C4 в 50 мМ ацетате аммония, рН 5,2, 10 мМ MgCl₂. тРНК элюировали градиентом 0 – 10% изопропанола в том же буфере, осаждали, как было описано выше, высушивали на воздухе и растворяли в 10 мМ трис-НСl, рН 7,5 для дальнейшего использования.

2.4.10. Окисление тРНК периодатом натрия. Лишённую акцепторной активности тРНК^{Про} (CGG) *R. palustris* с окисленными 2'- и 3'-гидроксильными группами рибозы 3'-концевого аденозина получали следующим образом. 100 мкг тРНК в объёме 32 мкл обрабатывали 3,3 мМ периодата натрия в присутствии 100 мМ натрий-ацетатного буфера, рН 5,3 в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением глюкозы до концентрации 5 мМ. Окисленную тРНК осаждали тремя объёмами этанола, центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин, растворяли в 10 мМ трис-НСl, рН 7,5 и хранили при -20 °С.

2.4.11. Замена А76 тРНК на 2'd-А76 и 2'F-А76. Методика включала последовательно отщепление ССА-конца тРНК^{Про} *R. palustris* (тРНК^{Про} Rp) и тРНК^{ПроАла} *E. faecalis* (тРНК^{ПроАла} Ef) при помощи фосфодиэстеразы яда *Crotalus adamanteus* и достройку СС*А конца с соответствующим производным аденина при помощи терминальной тРНК-нуклеотидилтрансферазы *Bacillus stearothermophilus*. Реакционная смесь для отщепления ССА-конца тРНК включала 50 мМ трис-НСl рН 8,0, 10 мМ MgCl₂, 0,32 мг/мл тРНК и 0,02 U/мл фосфодиэстеразы. После 15 мин инкубации при комнатной температуре смесь экстрагировали равным объёмом фенола, насыщенного 10 мМ ацетатным буфером, рН 6,0 и осаждали обработанную тРНК из отобранной водной фазы тремя объёмами этанола. Смесь центрифугировали в течение 10 мин при 12000 об/мин, осадок высушивали под вакуумным насосом и растворяли в буферном растворе, содержащем 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 4 мМ MgCl₂ и 10% изопропанол. Следы необработанной тРНК удаляли путём ионообменной хроматографии высокого давления на колонке VAX 1S фирмы "Dionex" с сорбентом на основе ДЭАЭ-полиметакрилата объёмом 0,73 мл. тРНК элюировали градиентом концентрации NaCl от 0,2 до 1 М в присутствии 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 4 мМ MgCl₂ и 10% изопропанола. Очищенную тРНК без ССА-конца ренатурировали путём плавления при 95 °С и отжига в 200 мл остывающей воды в течение одного часа.

Реакционная смесь для достройки модифицированного СС*А-конца тРНК содержала 100 мМ глицин-NaOH, pH 9,0, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 15 мкМ тРНК без ССА, 100 мкМ СТР, 2 мМ 2'd-АТР или 2'F-АТР, 5 мкМ терминальную тРНК-нуклеотидилтрансферазу. После 30 мин инкубации при 60 °С обработанную тРНК осаждали тремя объёмами этанола. Смесь центрифугировали в течение 10 мин при 12000 об/мин, осадок высушивали под вакуумным насосом.

Для очистки полученной модифицированной тРНК препарат растворяли в буфере TBE, содержащем 50 мМ трис, 50 мМ борной кислоты, 1 мМ ЭДТА и наносили на 8 % ПААГ в присутствии 7 М мочевины. Полосу геля, содержащую тРНК, вырезали под ультрафиолетовым освещением. Модифицированную тРНК экстрагировали из геля тремя объёмами буферного раствора, содержащего 0,5 М NH₄Ac pH 5,5, 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 % ДСН. Частицы геля удаляли центрифугированием при 6000 об/мин в течение 15 мин, модифицированную тРНК из осветлённого раствора осаждали тремя объёмами этанола, центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин, растворяли в 10 мМ трис-HCl, pH 7,5 и хранили при -20 °С. Анализ полученных препаратов проводили в том же 8 % ПААГ с использованием аппарата Sequi-Gen GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell фирмы BioRad (США), позволяющего за счёт длины пробега (до 30 см) и малой толщины геля (0,4 мм) добиться разделения тРНК с разрешением до одного нуклеотида.

2.5. Методы работы с белками

2.5.1. Электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях. Для анализа клеточных лизатов, хроматографических фракций и полученных препаратов белков использовался метод гель-электрофореза белков в денатурирующих условиях, впервые описанный Лэммли [111]. Полиакриламидный гель, предназначенный для разделения денатурированных белков по молекулярной массе в электрическом поле, состоял из двух слоёв –

концентрирующего и разделяющего. Концентрирующий гель содержал 5% акриламид, 0,12% N,N'метиленбисакриламид, 0,1 М трис-НСl, рН 6,8, 0,1% ДСН. Разделяющий гель содержал 12,5 акриламид, 0,3% N,N'метиленбисакриламид, 0,375 М трис-НСl рН 8,8, 0,1% ДСН. Полимеризацию проводили в присутствии 0,005% тетраметилэтилендиамин (TEMED) и 0,15% персульфат натрия (ПСА). Трис-глициновый электродный буферный раствор рН 8,3 содержал 0,05 М трис, 0,384 М глицин и 0,1% ДСН. В состав проб помимо разделяемых белков входили 0,025 М трис, 0,192 М глицин 5 % β-меркаптоэтанол, 1 % ДСН, 5% сахараза и 0,05% бромфеноловый синий. При разгонке на приборе SE-250 фирмы BioRad при прохождении пробами разделяющего геля напряжение составляло 10-20 мА, при прохождении разделяющего геля – 30-40 мА. После окончания разгонки гели фиксировали и окрашивали при 100°C в 7% уксусной кислоте и 0,25% красителе Coomassie R-250.

2.5.2. Определение концентрации белка по методу Бредфорд. Концентрации белков в препаратах и хроматографических фракциях измерялись по методу Бредфорд [112], основанному на изменении максимума поглощения красителя Coomassie G-250 при связывании с белком в кислой среде. Пробы содержали 0,067 г/л Coomassie G-250, 3,2% этанола, 5,7% ортофосфорной кислоты. После 5 мин инкубации их анализировали на основании оптического поглощения при OD₆₀₀. Концентрацию белков рассчитывали по калибровочной кривой, построенной по бычьему сывороточному альбумину (БСА).

2.5.3. Выделение и очистка рекомбинантных ПроРС. Рекомбинантную ПроРС дикого типа и её мутантные формы экспрессировали в культурах *E. coli*, штамм BL21(DE3) Star. Культуру наращивали в калий-фосфатной среде при 37 °С до OD₆₀₀ 0,6 – 0,8 о.е. и индуцировали экспрессию рекомбинантного белка добавлением ИПТГ до 1 мМ. Экспрессию проводили в течение 3 ч при 37 °С и интенсивном перемешивании. Затем культуру охлаждали на льду в течение 20 мин и осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин при 4 °С. Супернатант удаляли, клеточные осадки замораживали при -20 °С. После однократного замораживания и оттаивания клетки суспендировали в 75 мл

буфера 20 мМ трис-НСl рН 8,0, 2 мМ ДТТ, 0,1 мМ ЭДТА, 0,017 мг/мл фенилметансульфонилфлюорид (PMSF) и лизировали добавлением лизоцима до концентрации 0,5 мг/мл 30 мин на льду, после чего обрабатывали ультразвуком на соникаторе, пятью циклами по 30 с, с промежутками по 1 мин. Полученный лизат осветляли центрифугированием в течение 30 мин при 14000 об/мин. Осветлённый лизат подвергали ступенчатому высаливанию белков до концентраций сульфата аммония 40% и 80% от насыщения при 0 °С. Осадок одной трети объёма последней фракции растворяли в 5 мл указанного выше буфера, раствор диализовали против 1 л того же буфера в течение ночи при 4 °С. Отдиализованный раствор наносили на ДЭАЭ-сефарозу (V колонки 20 мл), промывали 800 мл указанного буфера до $OD_{280} < 0,1$ о.е., $OD_{260} < 0,1$ о.е. и элюировали в том же буфере градиентом NaCl 0-0,45 М 100 + 100 мл. Пиковые фракции ПроРС определяли по методу Бредфорд [112] и по тесту на аминокацилирующую активность. Фракции, содержащие ПроРС объединяли, высаливали 2 М сульфатом аммония, затем растворяли в минимально достаточном объёме 50 мМ калий-фосфатного буферного раствора, рН 7,5, содержащего 2 мМ ДТТ, 0,1 мМ ЭДТА и 0,017 мг/мл PMSF. Раствор наносили на колонку Toyopearl HW-60 (V колонки 30 мл), предварительно уравновешенную буфером, содержащим 2 М сульфата аммония. После промывки 15 мл того же буфера высоленные на колонке белки элюировали в градиенте концентраций сульфата аммония 2 - 0 М 100 + 100 мл. Пиковые фракции ПроРС объединяли, диализовали против 1 л 20 мМ трис-НСl рН 8,0, 2 мМ ДТТ, 0,1 мМ ЭДТА. Полученный раствор концентрировали при помощи концентраторов Millipore 10000 до концентрации порядка 10 мг/мл и анализировали по спектрам оптического поглощения и методом электрофореза по Леммли [111]. Чистота препаратов во всех случаях составила более 95%.

2.6. Ферментативные реакции

2.6.1. Анализ акцепторной активности тРНК^{Про}. Смесь для реакции аминокислотирования в объёме 130 мкл содержала 100 мМ трис-НСl pH 8,0, 20 мМ MgCl₂, 0,5 мг/мл БСА, 3 мМ АТФ, 3 мМ пролин, 20 мкМ ¹⁴С-меченый пролин (268 мКи/ммоль), 1 мкМ тРНК^{Про} и 50 нМ ПроРСЕf. В ходе реакции при 37 °С через установленные промежутки времени из реакционной смеси отбирали аликвоты по 20 мкл, осаждали тРНК и аминокислот-тРНК 10% ТХУ в объёме 200 мкл на холоду, после чего осадки переносили на фильтры, отмывали 50 мл 5 % ТХУ, высушивали и измеряли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счётчике.

2.6.2. Получение препаратов ¹⁴С-аланил тРНК^{ПроАла}. Реакцию проводили в объёме 0,5 мл при следующих концентрациях компонентов реакционной смеси: 600 нМ АлаРС *T. thermophilus*, 15 мкМ тРНК^{ПроАла}, 0,03 мМ аланин, 78 мкМ ¹⁴С-меченый аланин, 100 мМ трис-НСl, pH 7,5, 15 мМ MgCl₂, 0,5 мг/мл БСА, 3 мМ АТФ. Смесь инкубировали 20 мин при 37 °С, закисляли добавлением натрий-ацетатного буферного раствора pH 5,5 до 300 мМ, затем ¹⁴С-аланил тРНК^{ПроАла} очищали фенолом и хлороформом. Для этого к одному объёму раствора тРНК добавляли один объём фенола, насыщенного водным раствором 10 мМ трис-НСl, pH 8,0, перемешивали до состояния эмульсии, и центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин на охлаждённом до 4 °С роторе до разделения фаз. Затем отбирали водную фазу и добавляли к ней равный объём хлороформа, вновь перемешивали и центрифугировали в тех же условиях. К полученной водной фазе на льду добавляли два с половиной объёма 96% этанола t = -20 °С, встряхивали смесь в руках, и инкубировали 1 час при -20 °С. Затем смесь центрифугировали на роторе, охлаждённом до 4 °С в течение 10 мин при 12000 об/мин, удаляли супернатант, добавляли 20-30 мкл 70% этанола и центрифугировали 5 мин в тех же условиях. Удалив супернатант, осадок высушивали под вакуумным насосом в течение 5 мин и растворяли в 40 мкл 0,1 М натрий-ацетатного буферного раствора, pH 4,0.

2.6.3. Анализ гидролиза аланил-тРНК^{ПроАла}. Реакционная смесь в объёме 60 мкл содержала 60 нМ ПроРСЕf либо её мутантные формы, 100 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), pH 7,0, 10 мМ MgCl₂, 0,1 мг/мл БСА, 2 мМ ДТТ, 3,5 – 4,5 мкМ раствора ¹⁴С-аланил-тРНК^{ПроАла}, получение которого описано в предыдущем пункте. Реакция проводилась при 37 °С, аликвоты по 5 мкл отбирались в нулевой точке, через 1, 2, 3, 5 и 10 минут после начала реакции, и наносились на стекловолоконные фильтры, пропитанные 10% ТХУ. Затем фильтры промывали 50 мл 5% ТХУ, высушивали и анализировали на жидкостном сцинтилляционном счётчике.

2.6.4. Анализ гидролиза АТФ. Реакционная смесь в объёме 18 мкл содержала 100 мМ HEPES pH 7,5, 25 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ ДТТ, 1 мМ АТФ, 75 мкМ ¹⁴С-меченую АТФ (57,9 мКи/ммоль), 500 мМ аланин либо 250 мМ пролин, 15 мкМ тРНК^{Про} и 2 мкМ ПроРС. В ходе реакции при 37 °С отбирали аликвоты по 2 мкл и наносили их на полиэтиленимин целлюлозу (ПЭИ-целлюлозу), после чего разделяли АТФ, АДФ и АМФ методом тонкослойной хроматографии в 0,75 М калий-фосфатном буфере pH 3,5. Радиоактивность зон АТФ и АМФ анализировали при помощи сцинтилляционного счётчика либо фосфоимиджера.

2.6.5. Анализ гидролиза аланил-АМФ. Ферментативный гидролиз аланил-АМФ ПроРСЕf в присутствии тРНК^{Про} изучали следующим образом. Реакционную смесь, содержащую 0,1 М HEPES pH 7,5, 10 мМ MgCl₂, 0,5 М аланин, 2 мМ ДТТ, 0,16 мМ АТФ и следовые количества ³²P АТФ, инкубировали при 37°С в течение 10 мин с ПроРСЕf дикого типа или соответствующей мутантной формой фермента для накопления аланил-аденилата. Затем добавляли нативную тРНК^{Про}Rp до 11,5 мкМ, отбирали аликвоты по времени, разделяли АТФ, АМФ и аланил-АМФ путём тонкослойной хроматографии на ПЭИ-целлюлозе и анализировали их при помощи фосфоимиджера.

Для изучения неферментативного гидролиза аланил-АМФ к реакционной смеси после 10 мин инкубации добавляли пролил-сульфамоиладенилат до

конечной концентрации 10 мМ для конкурентного вытеснения аланил-АМФ из активных центров ПроРСЕ*f*. Отбор и анализ проб проводили аналогичным образом.

РАЗДЕЛ 3

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**3.1. Клонирование и экспрессия тРНК^{Про} и гибридной тРНК^{ПроАла}
*Enterococcus faecalis***

Получение высокоочищенных препаратов индивидуальных тРНК является важнейшим этапом в исследовании структуры и функции как самих этих молекул, так и других компонентов аппарата белкового синтеза. Наиболее распространены два пути получения препаративных количеств тРНК: суперпродукция *in vivo* (например, под *lpp*-промотором [113]) и транскрипция с помощью РНК-полимеразы фага T7 *in vitro*. В некоторых случаях может также применяться химический синтез [114].

Преимуществом метода, основанного на использовании РНК-полимеразы фага T7 является высокая эффективность транскрипции, простота эксплуатации, удобство в работе с наборами мутантов, сравнительно невысокая себестоимость продукта. Отсутствие ферментов, модифицирующих азотистые основания, в реакционной смеси *in vitro* даёт возможность получить гомогенный препарат, молекулы тРНК в котором не разнятся по числу модификаций, как это может происходить при суперпродукции *in vivo*. Гомогенность препарата особенно важна при сокристаллизации тРНК с белками. С другой стороны, недостаток этого подхода – зависимость эффективности инициации транскрипции от первого основания синтезируемой РНК. Таким образом, выбор подхода зависит от конкретной научной задачи. В данном случае он определялся требованиями к гомогенности молекул тРНК в препарате.

Бактериальные тРНК^{Про} характеризуются наличием цитозина на 5'-конце молекулы, что затрудняет инициацию транскрипции T7-полимеразой [115]. Эффективным подходом для решения проблемы 5'-концевого цитозина стало

использование коэкспрессии тРНК с цис-гидролитическим рибозимом на 5'-конце [116]. При этом близость размеров тРНК и рибозима ставит вопрос об их эффективном разделении. Для этой цели применяется жидкостная хроматография: гель-фильтрация [117], либо анионообменная хроматография [118].

К недостаткам препаратов тРНК, полученных путём экспрессии *in vitro* следует отнести полное отсутствие у них посттранскрипционных модификаций, характерных для нативных тРНК. Поэтому изначально для экспрессии тРНК^{Pro} *Enterococcus faecalis* (тРНК^{Pro} *Ef*) нами были применены два различных подхода. Ген был встроен в вектор pUC18 под контролем промотора фага T7 для экспрессии *in vitro*, а также в вектор pBSTNAV3 [113] под контролем *lpp*-промотора и *trnc*-терминатора для экспрессии в клетках *E. coli*. Однако, экспрессия тРНК^{Pro} *Ef in vivo* по невыясненным причинам оказалась совершенно неэффективной, что вынудило нас сделать выбор в пользу транскрипта тРНК^{Pro} *Ef* и нативной тРНК^{Pro} *Rhodopseudomonas palustris* (тРНК^{Pro} *Rp*) с антикодоном CGG.

3.1.1. Клонирование и экспрессия тРНК^{Pro} *Enterococcus faecalis*

3.1.1.1. Создание генноинженерной конструкции для экспрессии тРНК^{Pro} *E. faecalis in vitro*. Последовательности генов тРНК^{Pro} *Ef*, цис-гидролитического рибозима [119] и последовательность T7-промотора в виде шести пар дезоксиолигонуклеотидов (рис. 3.1, а) были лигированы в вектор pUC18 по сайтам рестрикции BamHI и EcoRI. Полученная генноинженерная конструкция для экспрессии тРНК^{Pro} *Ef in vitro* (рис. 3.1 б) содержит гены рибозима и тРНК под контролем T7-промотора. Для правильной терминации транскрипции на 3'-конце гена тРНК была введена последовательность сайта узнавания рестриктазы BstNI, частично совпадающая с последовательностью гена, частично лежащая вне его (рис. 3.1, в). По этому сайту конструкция разрезается при её подготовке к транскрипции, причём место разреза кодирующей цепи совпадает с концом кодирующей последовательности тРНК.

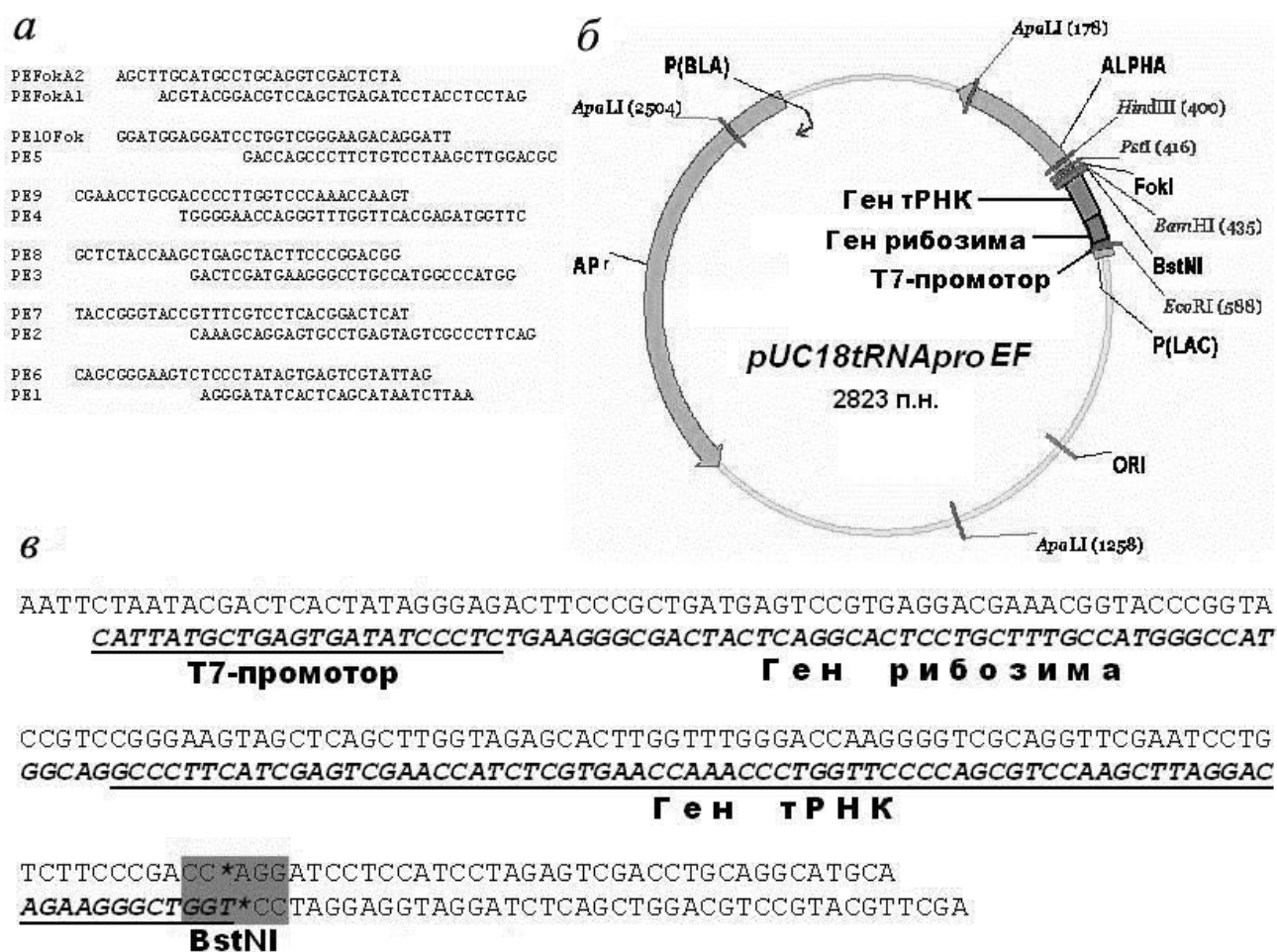


Рис. 3.1. Генноинженерная конструкция для экспрессии тРНК^{Pro}*Ef* *in vitro*: *а* – шесть пар химически синтезированных олигонуклеотидов, составляющих кодирующую вставку. *б* – общая схема экспрессирующей конструкции, полученной на основе вектора pUC18. *в* – расположение функциональных элементов в кодирующей вставке

3.1.1.2. Обеспечение правильной работы рибозима вируса круглой пятнистости табака, коэкспрессированного с тРНК^{Pro}*Ef*. Синтез котранскрипта начинается с гуанозина на 5'-конце рибозима, что обеспечивает высокую эффективность работы РНК-полимеразы фага Т7. Синтезированный котранскрипт может иметь различную вторичную структуру, так как 5'-концевая последовательность тРНК, примыкающая к 3'-концу последовательности рибозима [119], комплементарна и 5'-концу рибозима, и 3'-концу тРНК. При этом саморазрезание котранскрипта за счёт каталитической активности рибозима возможно только при комплементарном спаривании 5'-

конца тРНК и 5'-конца рибозима (рис. 3.2). Чтобы дать возможность всем молекулам котранскрипта приобрести необходимую для разрезания конформацию, необходимы циклы плавление-отжиг, после каждого из которых растёт доля разрезанного котранскрипта.

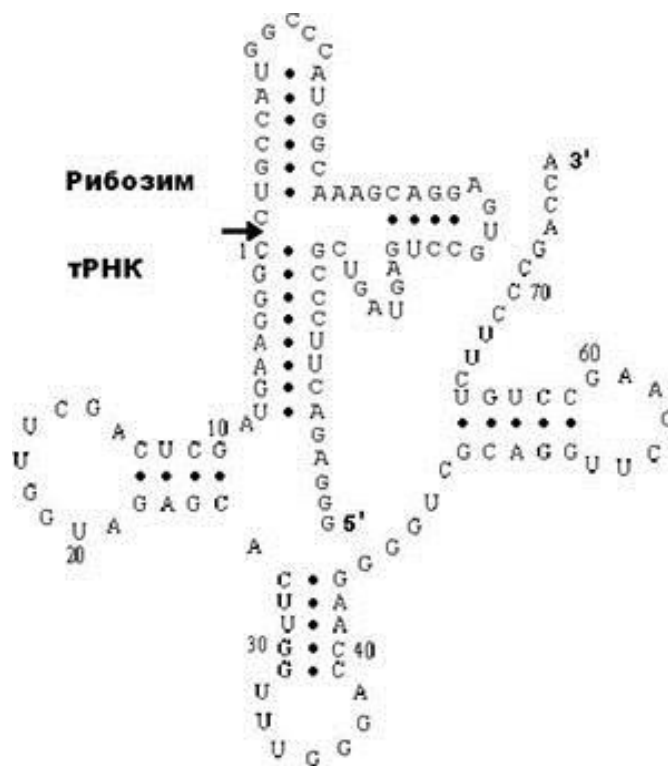


Рис. 3.2. Предполагаемая вторичная структура котранскрипта тРНК и цис-гидролитического рибозима, необходимая для его саморазрезания. 5'-конец рибозима комплементарно спарен с 5'- концом тРНК, вторичная структура акцепторного стебля тРНК при таком способе укладки не формируется. Остальные элементы вторичной структуры тРНК показаны в обычной ориентации "клеверного листа". Стрелкой указано место разрезания

После отщепления рибозима он может оставаться связанным с тРНК комплементарными взаимодействиями, что создаёт трудности для их хроматографического разделения без применения детергентов. В качестве фактора, способствующего ослаблению комплементарного связывания тРНК с рибозимом было избрано повышение температуры до +57 °С во время

хроматографии, что соответствует температурной устойчивости применённой хроматографической колонки.

3.1.1.3. Очистка и характеристика тРНК^{Про}*Ef*. Для хроматографической очистки транскрипта использовали ионообменную колонку WAX-1S, содержащую ДЭАЭ-полиметакрилат, что позволило отделить в градиенте NaCl транскрипт тРНК от рибозима и остатков ковалентного комплекса тРНК-рибозим (рис. 3.3), что подтверждено геле-электрофорезом (рис. 3.4).

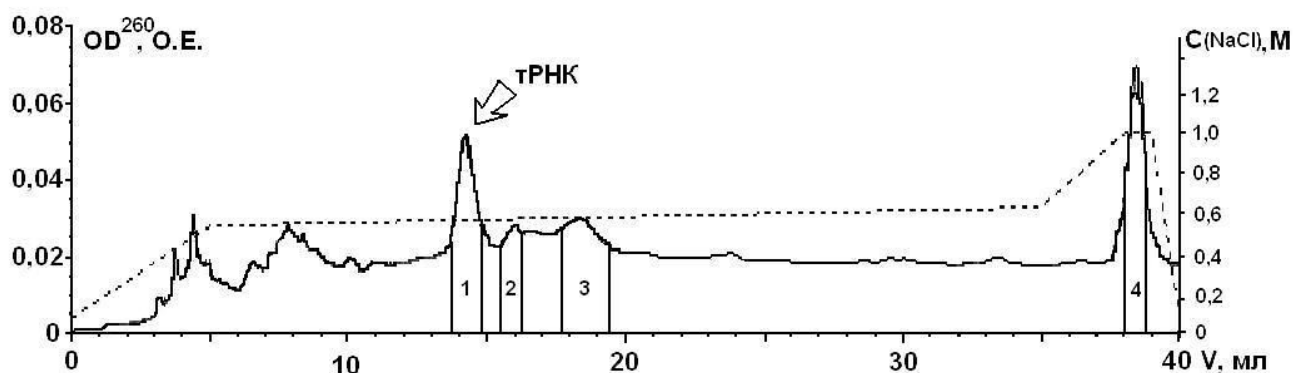


Рис. 3.3. Хроматограмма котранскрипта тРНК^{Про}*Ef* и цис-гидролитического рибозима. Состав фракций: 1 – тРНК^{Про}, 2 – тРНК^{Про} + рибозим, 3 – рибозим, 4 – неидентифицированные фрагменты РНК

Конечный выход транскрипта тРНК с 1 мг ДНК-матрицы составил 0,8 мг. Начальная скорость аминоацилирования транскрипта практически совпадает с начальной скоростью аминоацилирования нативной тРНК^{Про}*Rp* (CGG) (рис. 3.5) Реакция проводилась при 37 °С в присутствии 14,6 нМ ПроРС*Ef* и 197,6 мкМ тРНК. Чистота препаратов проверена методом электрофореза в полиакриламидном геле и составила более 80% (рис. 3.4). Преимущества данного метода обеспечиваются использованием ВЭЖХ на анионообменном сорбенте ДЭАЭ-полиметакрилате (колонка WAX-1S фирмы "Dionex") для очистки препаратов от цис-гидролитического рибозима, необходимого для эффективного синтеза РНК. Данный метод впервые применён для решения

такой задачи, и может быть использован для очистки транскриптов любых типов тРНК, что требует лишь незначительной оптимизации условий проведения хроматографии.



Рис. 3.4. Электрофореграмма фракций хроматограммы котранскрипта тРНК^{Pro}*Ef* и цис-гидролитического рибозима. Н – смесь, наносившаяся на колонку, далее номера фракций. 1 – тРНК^{Pro}*Ef*, 2 – тРНК^{Pro}*Ef* + рибозим, 3 – рибозим, 4 – неидентифицированные фрагменты РНК. Справа электрофореграмма препарата транскрипта тРНК^{Pro}*Ef* и неразделённой смеси с рибозимом

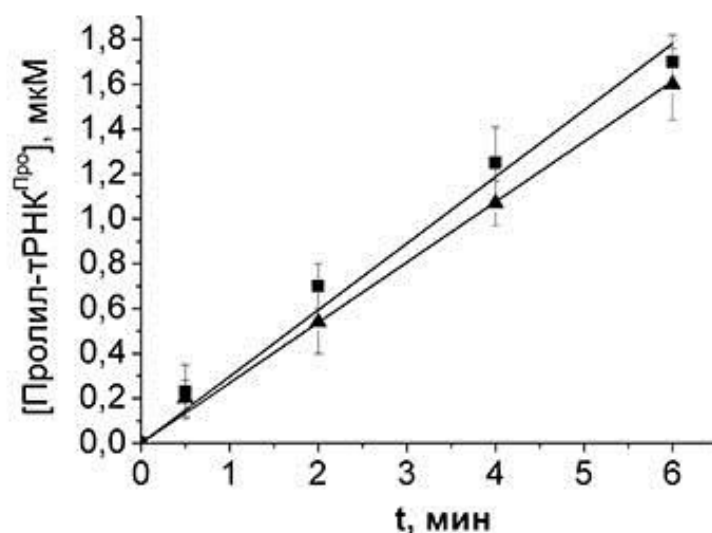


Рис. 3.5. Аминоацилирование пролином транскрипта тРНК^{Pro}*Ef* (▲) и тРНК^{Pro}*Rp* (■)

Несомненными преимуществами данного метода перед очисткой транскриптов тРНК в полиакриламидном геле является скорость проведения процедур и низкий расход дорогостоящих материалов, а также высокий выход продукта, обусловленный низким уровнем потерь при очистке.

3.1.2. Клонирование и экспрессия гибридной тРНК^{ПроАла}, узнаваемой пролил- и аланил-тРНК синтетазами. Разработка метода детекции посттрансферной редактирующей активности ПроРС требует получения препаратов радиоактивно меченой аланил-тРНК^{Про}. При изучении других АРС неоднократно практиковалось получение подобных ошибочных продуктов в препаративных количествах с использованием мутантных форм АРС, дефицитных по редактированию. Однако, связывание аланина ПроРС характеризуется высокой константой Михаэлиса, а создание высокой концентрации меченой аминокислоты в реакционной смеси аминоацилирования неоправданно дорого и малоэффективно. Поэтому для изучения посттрансферной редактирующей активности ПроРС_{Ec} ранее была создана гибридная тРНК^{ПроАла} на основе тРНК^{Про}_{Ec}, несущая элементы узнавания как для ПроРС, так и для АлаРС [107; 98]. Это позволило аминоацилировать её аланином при помощи АлаРС, а затем наблюдать деацилирование аланил-тРНК^{ПроАла} путём посттрансферного редактирования ПроРС. Перед нами в процессе изучения редактирующих механизмов ПроРС_{Ef} встала аналогичная задача.

3.1.2.1. Выбор элементов узнавания химерной тРНК^{ПроАла}_{Ef}. В отличие от узнавания ПроРС тРНК^{Про} [120], в узнавании тРНК^{Ала} АлаРС *E. coli* антикодон не принимает участия [121]. Ключевым элементом узнавания тРНК^{Ала} является неканоническая нуклеотидная пара G3:U70 [122]. Бактериальные тРНК^{Про} несут в этих положениях каноническую нуклеотидную пару G3:C70. При этом, как было показано путём сайт-направленного мутагенеза тРНК^{Про}_{Ec}, мутация C70U тРНК^{Про} ведёт к снижению акцепторной активности при аминоацилировании пролином примерно в 6 раз [120]. Однако, эффективное узнавание АлаРС также требует

замены нуклеотидной пары тРНК^{Про} C1:G72 на G1:C72, что ведёт к падению акцепторной активности в 77 раз [120]. Таким образом, гибридная тРНК практически теряет способность к узнаванию в аминоацилирующем активном центре ПроРС, что, впрочем, не противоречит поставленной задаче.

3.1.2.2. Клонирование гена гибридной тРНК^{ПроАла}*Ef*, её экспрессия и очистка. Гибридная последовательность гена тРНК^{ПроАла}*Ef*, содержащая однонуклеотидные замены C1G, C70U и G72C, необходимые для введения в её последовательность элементов узнавания АлаРС (рис. 3.6), и последовательность Т7-промотора в виде одной пары частично комплементарных дезоксиолигонуклеотидов (рис. 3.7.) была достроена до

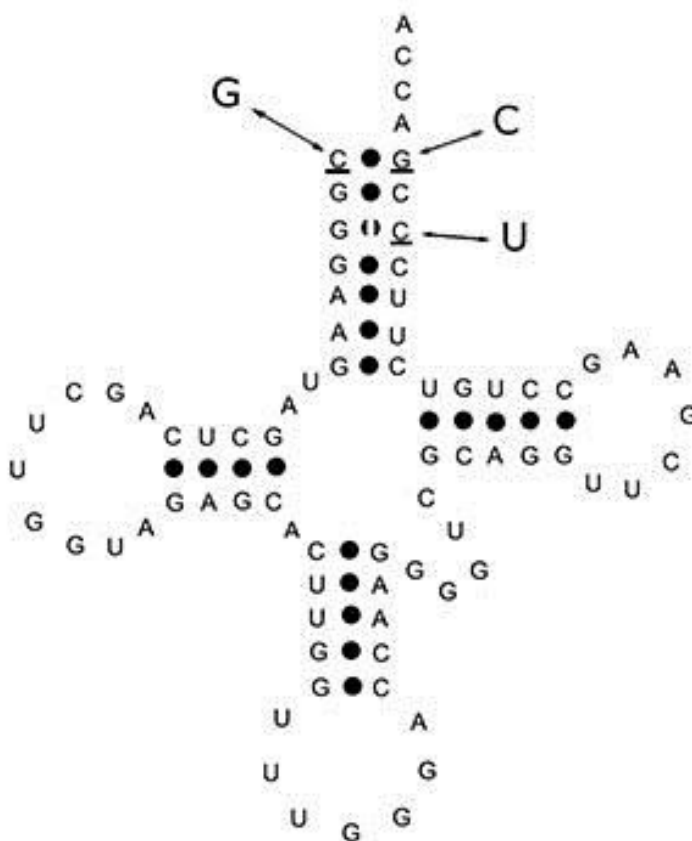


Рис. 3.6. Нуклеотидные замены в тРНК^{Про}*Ef*, введённые для создания гибридной тРНК^{ПроАла}*Ef*, способной к узнаванию бактериальными АлаРС

полностью двухцепочечной структуры с помощью ДНК-полимеразы Pfu и лигирована в вектор pCR2.1 при помощи набора для лигирования ПЦР-продуктов CloneJet (Thermo Scientific).

tAPEF-1 (68 н)

5' - GAATTC *TAATACGACTCACTATA* **G**GGGAAGTAGCTCAGCTTGGTAGAGCACTTG
GTTTGGGACCAAGG-3'

tAPEF-2 (65 н)

5' - GGATCC TGGT **GGA**GGAAGACAGGATTCGAACCTGCGACCCCTTGGTCCCAAACCA
AGTGCTCTACC-3'

Рис. 3.7. Последовательности олигонуклеотидов для клонирования гена тРНК^{ПроАла}*Ef* в векторе pUC18. Последовательность, кодирующая тРНК выделена серым, последовательность T7-промотора – курсивом, последовательности сайтов BamHI и EcoRI – подчеркнуты. Введённые в последовательность гена тРНК^{Про}*Ef* мутации выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты. 27 нуклеотидов на 3'-концах последовательностей комплементарны

Полученная конструкция была наработана в культуре клеток *E. coli* DH5 α , выделена и разрезана по сайтам рестрикции BamHI и EcoRI. Участок ДНК, содержащий T7-промотор и ген тРНК^{ПроАла}*Ef* был очищен на агарозном геле и встроен в вектор pUC18.

Полученную генноинженерную конструкцию проверяли путём секвенирования. Экспрессия и выделение тРНК^{ПроАла} проводились аналогично таковым для тРНК^{Про}*Ef*, за исключением отсутствия необходимости в коэкспрессии тРНК с цис-гидролитическим рибозимом и их последующего разделения. Чистота полученного препарата составила более 90%.

3.1.2.3. Биохимические свойства тРНК^{ПроАла}*Ef*. Гибридная тРНК^{ПроАла}*Ef* узнаётся и эффективно аминоацилируется АлаРС *T. thermophilus* (рис. 3.8, а). Это дало возможность использовать данную тРНК для получения препаратов ¹⁴С-аланил-тРНК^{ПроАла}*Ef*. ¹⁴С-аланил-тРНК^{ПроАла}*Ef* эффективно гидролизуется ПроРС*Ef* путём посттрансферного редактирования (рис. 3.8, б). Таким образом, стало возможным экспериментально разделить посттрансферное редактирование ПроРС*Ef* и претрансферное редактирование, вносящее свою лепту в накопление АМФ в классическом тесте на редактирование.

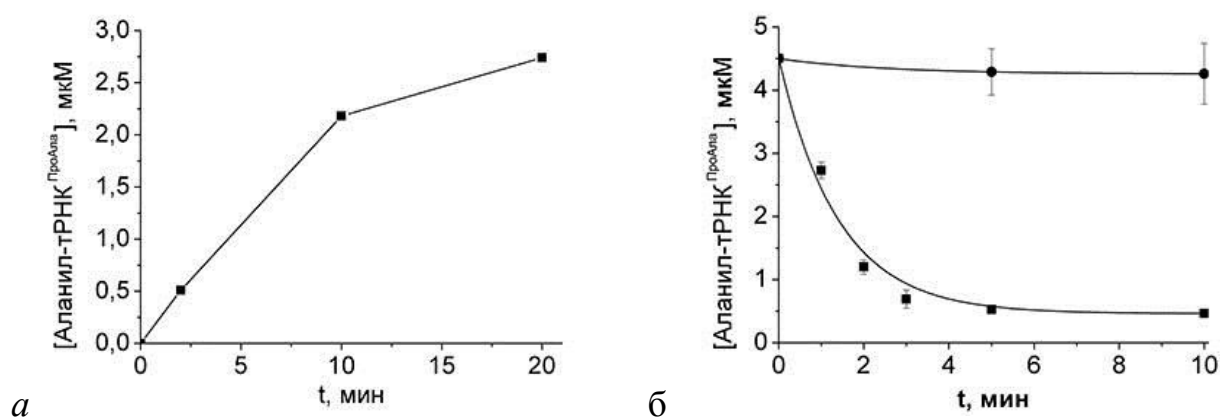


Рис. 3.8. Биохимические свойства тРНК^{ПроАла}*Ef*: а: аминоацилирование тРНК^{ПроАла}*Ef* аланином в присутствии 0,6 мкМ АлаРС *T. thermophilus*. б: деацилирование аланил-тРНК^{ПроАла} 60 нМ ПроРС*Ef* (■) и её неферментативное деацилирование (●)

Выводы к подразделу 3.1.:

- Создана генноинженерная конструкция для экспрессии тРНК^{Про}*Ef* *in vitro*. Ген тРНК^{Про}*Ef*, слитый с геном цис-гидролитического рибозима, клонирован при помощи вектора рUC18 и экспрессирован *in vitro*. Подтверждена чистота и акцепторная активность полученного препарата тРНК^{Про}*Ef*. Показана равная эффективность узнавания ПроРС*Ef* транскрипта тРНК^{Про}*Ef* и тРНК^{Про}*Rp*.

- Ген гибридной тРНК^{ПроАла}*Ef*, содержащий детерминанты узнавания тРНК^{Ала}, клонирован при помощи вектора pUC18 и экспрессирован *in vitro*. Подтверждены чистота и акцепторная активность полученного препарата тРНК^{ПроАла}*Ef*.
- Показано, что тРНК^{ПроАла}*Ef* акцептирует аланин в присутствии АлаРСЕс, после чего деацилируется в присутствии ПроРСЕф.

Результаты исследований, приведённых в подразделе, опубликованы в работах:

1. Клонирование, экспрессия и очистка тРНК^{Про} из бактерии *Enterococcus faecalis* / Бояршин К.С., Крикливый И.А., Яремчук А.Д., Тукало М.А. // *Biopolimers and Cell.*- 2009.- Vol. 25, N. 6.- P. 445-450.
2. Предполагаемый активный центр редактирующего домена пролил-тРНК синтетазы бактерии *Enterococcus faecalis* / Бояршин К.С., Крикливый И.А., Раевский А.В., Химин А.А., Яремчук А.Д., Тукало М.А. // *Біополімери і клітина.* -2009. -Т.25, № 1.-С. 39-43.
3. Створення генних конструкцій та експресія *in vitro* і *in vivo* тРНК^{Про} із *Enterococcus faecalis* / Бояршин К.С., Крикливий І.А., Коваленко О.П., Яремчук Г.Д. // *Матеріали ІХ Українського біохімічного з'їзду.* Жовтень 2006, Харків. Сб. тезисов, с. 32.

3.2. Изучение роли тРНК в претрансферном редактировании пролил-тРНК синтетазой

В экспериментах *in vitro* распад и повторный синтез продуктов, подлежащих редактированию, приводит к постоянному расходу АТФ и накоплению АМФ в реакционной смеси, независимо от того, каким образом происходит редактирование [46]. Аминокислота и тРНК при этом не

расходуется, позволяя изменяться концентрации только одного из субстратов. Метод, основанный на накоплении АМФ, был применён нами для изучения путей редактирования ПроРС*Ef* продуктов ошибочного узнавания аланина.

В наших опытах по гидролизу АТФ в присутствии редактируемой аминокислоты (500 мМ аланина) суммарный уровень редактирования ПроРС*Ef* (расход АТФ как следствие и претрансферного, и посттрансферного редактирования) повышался в несколько раз при добавлении тРНК^{Про} до концентрации 15 мкМ (рис. 3.9). В этом и последующих экспериментах использовалась нативная тРНК^{Про}*Rp*, узнаваемая ПроРС*Ef* наравне с транскриптом тРНК^{Про}*Ef*, как было показано в разделе 1. Ускорение гидролиза АТФ при добавлении тРНК^{Про} можно было интерпретировать и как результат только посттрансферного редактирования, и как суммарный результат посттрансферного и тРНК-зависимого претрансферного редактирования.

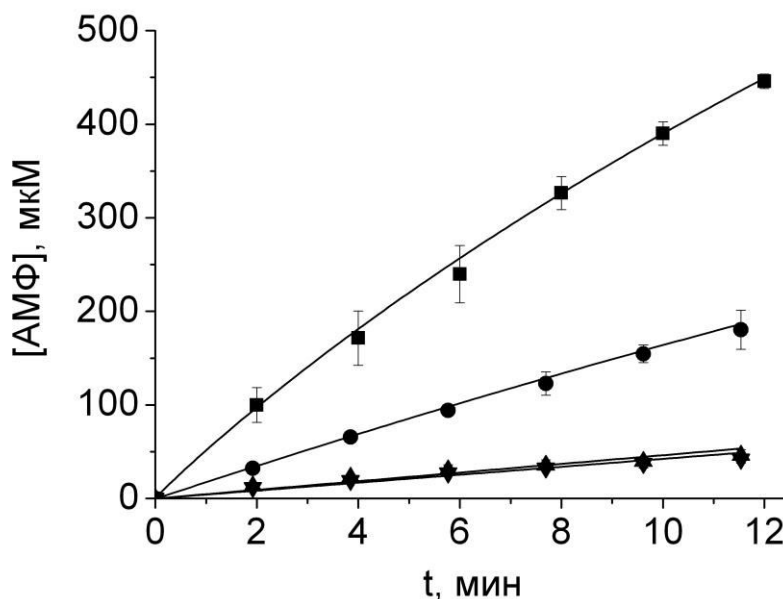


Рис. 3.9. Накопление АМФ в результате процессов редактирования. тРНК-независимое претрансферное редактирование в присутствии ПроРС дикого типа без тРНК (▲) и ПроРС К279А без тРНК (▼). тРНК-зависимое претрансферное редактирование в присутствии ПроРС К279А и тРНК^{Про}*Rp* (●). Претрансферное и посттрансферное редактирование в присутствии д.т. ПроРС и тРНК^{Про}*Rp* (■). Концентрация ПроРС 2 мкМ, тРНК – 15 мкМ

Чтобы получить возможность для более чёткой интерпретации полученных результатов была использована мутантная форма фермента с аминокислотной заменой K279A в домене, ответственном за посттрансферное редактирование, практически полностью лишённая посттрансферной редактирующей активности. Ранее были описаны аналогичные свойства мутантной формы K279A ПроPCEc [98]. Структурная роль этого аминокислотного остатка была показана путём молекулярного моделирования [52].

Использование ПроPCEf K279A дало нам возможность оценивать только претрансферную редактирующую активность в опытах по гидролизу АТФ в присутствии редактируемой аминокислоты, отражающих суммарное редактирование. Таким образом, использование мутантной формы ПроPCEf K279A, характеризующейся практическим отсутствием посттрансферной редактирующей активности, в тесте на накопление АМФ позволило нам экспериментально разделить посттрансферное редактирование и тРНК-зависимое претрансферное редактирование. В результате было отмечено повышение уровня претрансферного редактирования в присутствии тРНК^{Pro} (рис. 3.9).

В присутствии нативной тРНК^{Pro}Rp и мутантной формы ПроPCEf K279A скорость накопления АМФ примерно втрое больше, чем в аналогичной смеси без тРНК (рис. 3.9, табл. 3.1). В присутствии фермента дикого типа и нативной тРНК^{Pro}Rp скорость накопления продукта возрастает ещё примерно втрое (табл. 3.1), за счёт подключения посттрансферного редактирования, заблокированного в мутантной форме.

3.2.1. Характер тРНК-зависимости претрансферного редактирования ПроPCEf. Сравнение наблюдаемых констант скорости накопления АМФ со скоростью спонтанного гидролиза аланил-аденилата в аналогичном растворе (табл. 3.1) показало, что как тРНК-зависимое, так и тРНК-независимое редактирование ПроPCEf являются каталитическими процессами, и не сводятся к избирательному высвобождению аланил-аденилата из активного центра

Таблица 3.1

Наблюдаемые константы скорости накопления АМФ в ходе редактирования ПроРС*Ef* против аланина.

Концентрация ПроРС 2 мкМ, тРНК – 15 мкМ

k_{obs}, c^{-1}			
Суммарное редактирование (Д.т. ПроРС+ тРНК ^{Pro})	тРНК-зависимое претрансферное редактирование (ПроРС K279A + тРНК ^{Pro})	тРНК-независимое претрансферное редактирование (Д.т. ПроРС без тРНК)	Неферментативный гидролиз аланил-аденилата
0,433±0,065	0,131±0,014	0,039±0,013	$(7,8±1,7) \times 10^{-4}$

фермента. Помимо накопления АМФ, в отсутствие тРНК (а также в присутствии транскрипта тРНК^{Pro}*Ef*) наблюдается накопление аланил-АМФ, чего не происходит в присутствии нативной тРНК^{Pro}*Rp* (рис. 3.10). Добавление

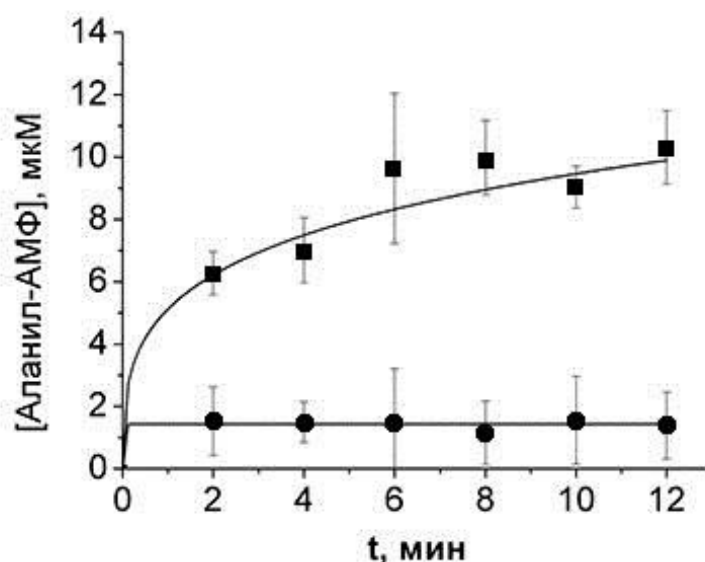


Рис. 3.10. Селективное высвобождение аланил-АМФ из активного центра ПроРС*Ef*. Дикий тип ПроРС без тРНК (■) и в присутствии нативной тРНК^{Pro}*Rp* (●)

11,5 мкМ нативной тРНК в реакционную смесь ведёт к экспоненциальному падению концентрации аланил-АМФ. Дикий тип фермента, и мутантные формы K279A и H366A, несущие мутации в редактирующем домене, ведут себя в этом процессе схожим образом (рис. 3.11). Этот эксперимент показывает значение присутствия тРНК именно для скорости гидролиза аланил-аденилата, а не для скорости его синтеза. Отсутствие значительного влияния мутаций в редактирующем домене свидетельствует в пользу локализации тРНК-зависимого претрансферного редактирования в синтетическом активном центре фермента.

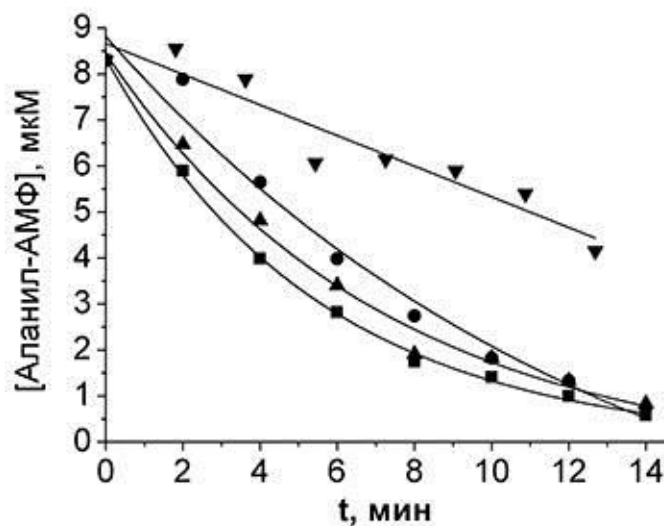


Рис. 3.11. Гидролиз аланил-АМФ ПроРС*Ef*. Д.т. ПроРС в присутствии тРНК^{Про}*Rp* (■), ПроРС K279A в присутствии тРНК^{Про}*Rp* (●), ПроРС H366A в присутствии тРНК^{Про}*Rp* (▲), д.т. ПроРС без тРНК (▼)

3.2.2. Модификация тРНК^{Про} путём окисления периодатом натрия.

Претрансферное редактирование у изученных ранее аминоксил-тРНК синтетаз протекает либо непосредственно в аминокислилирующем активном центре [45], либо в том же активном центре, что и посттрансферное редактирование [64]. В обоих случаях с местом претрансферного редактирования в наибольшей степени сближается 3'-конец тРНК, что ставит вопрос о его возможной роли в индукции гидролиза ошибочно синтезированного аминоксил-аденилата.

Проведённый нами эксперимент по гидролизу АТФ в присутствии аланина и тРНК^{Pro}*Rp* (CGG) с окисленными периодатом натрия 2'- и 3'-гидроксильными группами рибозы 3'-концевого аденозина показал ключевое значение этих групп для индукции претрансферного редактирования (рис. 3.12). Обработка

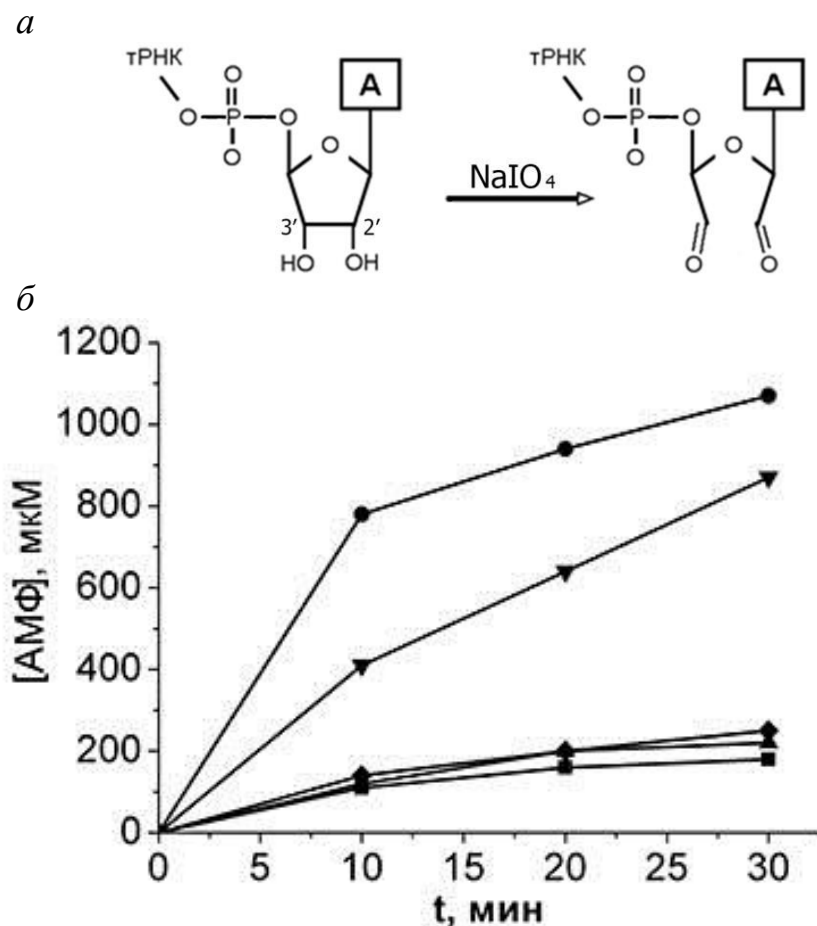


Рис. 3.12. Влияние обработки тРНК^{Pro} периодатом натрия на структуру её А76 (*a*), и на её участие в претрансферном редактировании (*б*). Редактирование ПроPSEf дикого типа (●) и её мутантной формой K279A (▼) против аланина в присутствии нормальной тРНК^{Pro}*Rp* (CGG). Редактирование ПроPSEf дикого типа (▲) и её мутантной формой K279A (◆) против аланина в присутствии той же тРНК, окисленной периодатом натрия. То же в присутствии дикого типа ПроPSEf, но без тРНК (■)

этим реагентом приводит к разрыву пентозного кольца рибозы А76 и вхождению кислорода 2'- и 3'-гидроксильных групп в состав карбоксильных групп

[123]. Таким образом, обе гидроксильные группы А76 прекращают своё существование, что может служить для экспериментальной оценки их участия в биохимических процессах.

Как видно из рис. 3.12, окисленная периодатом натрия тРНК полностью теряет способность влиять на скорость процессов редактирования, как в присутствии дикого типа *ProPCEf*, так и мутантной формы K279A.

3.2.3. Получение 2'- и 3'-dA76 производных тРНК^{Pro}. С целью проверки участия гидроксильных групп рибозы А76 тРНК^{Pro} в индукции редактирования нами были получены 2'- и 3'-dA76 производные тРНК^{Pro} *Rp*. Для этого препарат тРНК^{Pro} *Rp* (CGG) был подвергнут обработке фосфодиэстеразой *C. adamanteus*, что привело к отщеплению её одноцепочечного 3'-конца 74-ССА-76. Затем эта последовательность была достроена при помощи терминальной тРНК-нуклеотидилтрансферазы *B. stearothermophilus* в присутствии ЦТФ и, в одном случае 2'-dАТФ, в другом 3'-d АТФ (кордицепина) (рис. 3.13).

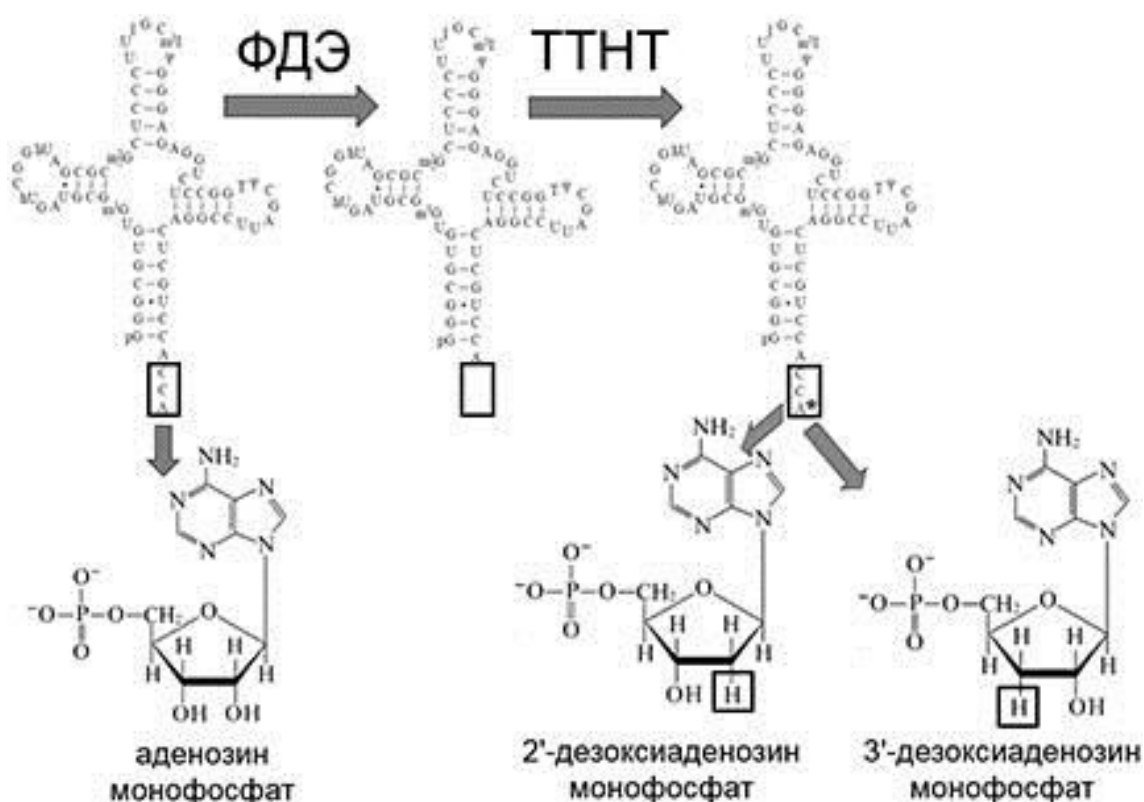


Рис. 3.13. Получение производных тРНК^{Pro} *Rp* по А76. ФДЭ – фосфодиэстераза, ТТНТ – терминальная тРНК-нуклеотидилтрансфераза

Полученные таким образом 2'-dA76 тРНК^{Про} и 3'-dA76 тРНК^{Про} были очищены путём электрофореза в ПААГ. После элюции тРНК из геля, чистота полученных препаратов контролировалась по электрофореграмме, с использованием прибора для секвенирующего электрофореза Sequi-Gen (BioRad, США) (рис. 3.14).

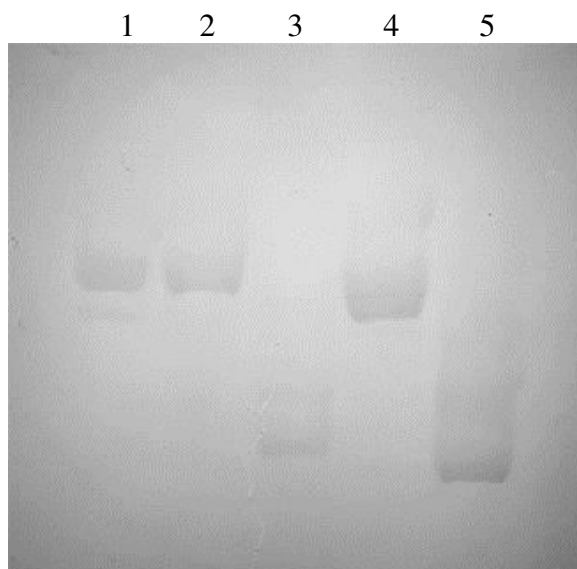


Рис. 3.14. 1- 2'-dA76 тРНК^{Про}, 2- 3'-dA76 тРНК^{Про}, 3 и 5- тРНК^{Про}*Rp* (CGG) с отщеплённой концевой последовательностью 74-ССА-76, 4- интактная тРНК^{Про}*Rp* (CGG)

3.2.4. Влияние производных тРНК^{Про} на претрансферное редактирование ПроРСЕf. 2'- и 3'-dA76 производные тРНК^{Про}*Rp* характеризовались многократно сниженной способностью к ускорению гидролиза АТФ в соответствующем тесте (рис. 3.15).

У ПроРС, как и у большинства АРС 2-го класса, 2'-гидроксильная группа А76 не принимает непосредственного участия в реакции аминоацилирования, что позволило нам проверить специфическую роль этой группы в претрансферном редактировании, сравнив падение скорости аминоацилирования и редактирования при её удалении.

Результаты этих экспериментов представлены на рис. 3.15. Как видно из этого рисунка, как 2'-, так и 3'-дезоксидификации А76 тРНК^{Про} приводят к

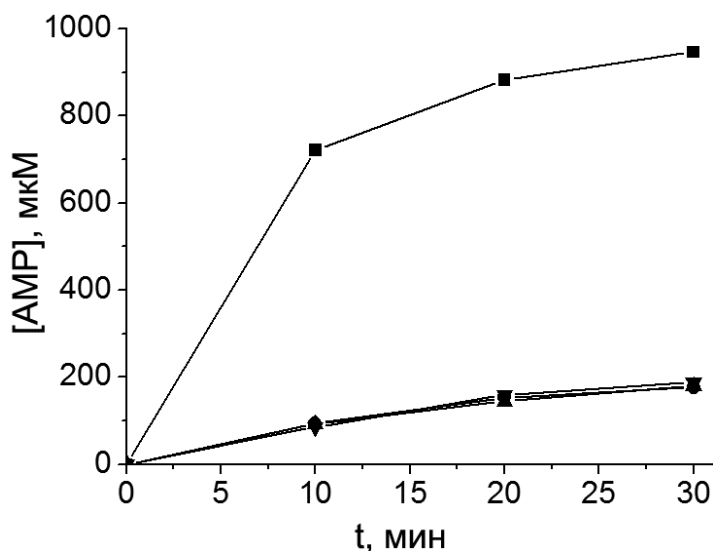


Рис. 3.15. Накопление АМФ вследствие активации аланина и редактирования продуктов в присутствии 2 мкМ ПроРСЕf и тРНК^{Pro} *Rp* дикого типа (■), в присутствии её 2'- (▼) и 3'-А76 (▲) производных, а также в отсутствие тРНК (●)

существенному падению как посттрансферной, так и тРНК-зависимой претрансферной редактирующей активностей. Анализ роли 3'-гидроксильной группы затруднён тем, что её замена на протон делает ферментативное аминоацилирование тРНК^{Pro} принципиально невозможным, а значит, исключает сравнение влияния замены на аминоацилирование и редактирование. Поэтому в дальнейшем мы сосредоточили внимание на роли 2'-гидроксильной группы. В результате 2'-дезокси модификации А76 тРНК^{Pro}, снижение скорости претрансферного редактирования составило порядка 90 раз (рис. 3.16, а), при снижении скорости аминоацилирования в 3-4 раза (рис. 3.16, б).

Как будет показано ниже, аминоксил-2'-dA76 тРНК^{Pro} практически полностью лишена способности подвергаться посттрансферному редактированию, и полученные данные отражают только влияние модификации на тРНК-зависимое претрансферное редактирование. Таким образом,

результаты экспериментов указывают на специфическую роль 2'-гидроксильной группы А76 тРНК^{Про} в претрансферном редактировании.

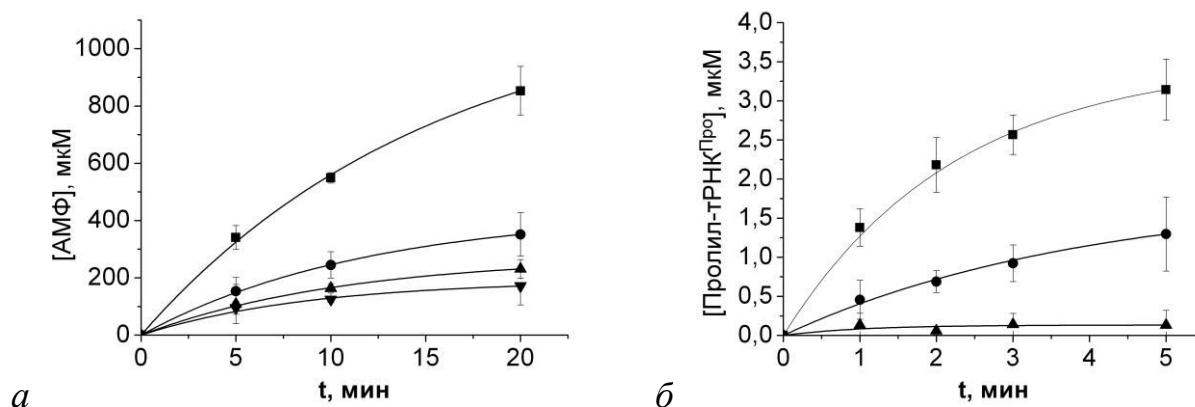


Рис. 3.16. Биохимические свойства 2'-dA76 тРНК^{Про}Rp: а – накопление АМФ в присутствии 0,5 мкМ ПроPSEf и тРНК^{Про}Rp (■), 20 мкМ ПроPSEf и 2'-dA76 тРНК^{Про}Rp (●), 20 мкМ ПроPSEf и тРНК^{Про}Rp без 74-ССА-76 (▲), 20 мкМ ПроPSEf без тРНК (▼); б – аминокислотирование тРНК^{Про}Rp (■) и 2'-dA76 тРНК^{Про}Rp (●) пролином. Контрольный эксперимент без ПроРС (▲)

Выводы к подразделу 3.2.:

- Показан феномен тРНК-зависимого претрансферного редактирования аланил-аденилата ПроPSEf.
- Получены 2'-dA76 и 3'-dA76 производные тРНК^{Про}Rp (CGG).
- тРНК-зависимое претрансферное редактирование аланина ПроPSEf является каталитическим механизмом, опосредованным 2'- и 3'-гидроксильными группами А76 тРНК^{Про}.
- В отсутствие тРНК^{Про} действуют механизмы тРНК-независимого претрансферного редактирования и селективного высвобождения аланил-АМФ.

Результаты исследований, приведённых в подразделе, опубликованы в работах:

1. тРНК-зависимое редактирование ошибок пролил-тРНК синтетазой из бактерии *Enterococcus faecalis* / Бояршин К.С., Крикливый И.А., Тукало М.А. // Український біохімічний журнал.-2008.-Т.80, № 61.-С. 52-59.
2. Роль тРНК^{Pro} в претрансферном редактировании аланина пролил-тРНК синтетазой / Бояршин К.С., Присс А.Е., Крикливый И.А., Коваленко О.П., Яремчук А.Д., Тукало М.А. // Biopolymers and cell.- 2013.- Vol. 29, N. 5.- P. 382-388.
3. тРНК участвует в обеспечении специфичности синтеза пролил-аденилата пролил-тРНК синтетазой бактерии *Enterococcus faecalis* / Бояршин К.С., Крикливый И.А., Тукало М.А. // Биология наука XXI века. 12-я международная пушинская школа-конференция молодых ученых. Ноябрь 2008, Пушино. Сб. тезисов, с. 9.
4. Изучение роли тРНК в претрансферном аминокислотном редактировании пролил-тРНК синтетазой бактерии *Enterococcus faecalis* / Бояршин К.С., Крикливый И.А., Яремчук А.Д., Тукало М.А. // Фундаментальные и прикладные исследования в биологии. Материалы 1-й международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, февраль 2009, Донецк. Тезисы, Т. 2, с. 98.
5. Pretransfer and posttransfer editing activity of prokaryote-type prolyl-tRNA synthetase of bacteria *Enterococcus faecalis* / Boyarshin K., Krikliivi I., Yaremchuk G., Tukalo M. // VII Parnas conference on biochemistry and molecular biology. The Ukrainian biochemical journal. -2009. V. 81, N 4, P. 159.
6. Structural basis of amino acid specificity maintenance by *Enterococcus faecalis* prolyl-tRNA synthetase / Boyarshin K., Krikliivi I., Yaremchuk G., Tukalo M. // Biopolymers and Cell. -2010. -V.26, № 5.,-P.416. Conference of young scientists.
7. tRNA-assisted editing by *Enterococcus faecalis* Prolyl-tRNA synthetase / Boyarshin K., Krikliivi I., Yaremchuk G., Tukalo M. // Biopolymers and Cell. -2011

. -V.27, № 4.,-P.314-315. Materials of the 5th Conference of IMBG Young Scientists (24-25 May 2011)

8. Роль 2'-ОН групи 3'-кінцевого аденозину тРНК^{Про} у реакціях аміноацилювання та претрансферного редагування проліл-тРНК синтетазою еубактерії *Enterococcus faecalis* / Прісс А.Є., Мазур П.С., Бояршин К.С. // Біологія: від молекули до біосфери. Матеріали VI Міжнародної конференції молодих науковців (Харків, 22-25 листопада 2011) стр. 112-113.

9. tRNA ensures amino acid specificity of enterococcal prolyl-tRNA synthetase on the two steps of editing / Boyarshyn K., Priss A., Rayevskiy A., Kriklivyi I., Kovalenko O., Il'chenko N., Dubey I., Yaremchuk A., Tukalo M. // 13th Young Scientists' Forum (3-6 July 2013 Saint Petersburg)

3.3. Изучение редактирующего активного центра ПроРСЕf методом сайт-направленного мутагенеза

Сайт-направленный мутагенез аминокислотных остатков фермента позволяет получить данные об относительной важности тех или иных химических групп боковых цепей этих остатков для правильного функционирования фермента. Сравнение этих данных со структурными данными, полученными кристаллографически или путём компьютерного моделирования, позволяет делать предположения о функциональной роли тех или иных аминокислотных остатков. Для изучения редактирующего домена ПроРС, катализирующего в своём активном центре единственную реакцию деацилирования аланил-тРНК^{ПроАла}, такой подход представился нам многообещающим (в отличие от аминацилирующего активного центра, где одни и те же мутации с большой вероятностью затронут различные ферментативные активности, сказываясь на способности фермента к активации аминокислоты, её переносу на тРНК^{Про}, селективному высвобождению аланина и претрансферному редактированию).

3.3.1. Выбор аминокислотных остатков редактирующего домена ПроРС для сайт-направленного мутагенеза. Позиции для сайт-направленного мутагенеза были выбраны исходя из ряда различных критериев. Аминокислотные остатки G331 и S332 вызвали интерес, как составляющие предполагаемый активный центр редактирующего домена на основании структурных данных и компьютерного моделирования (рис. 3.17) [52]. T257, K279 и H366 гомологичны аминокислотным остаткам ПроРСЕс, показавшим своё значение для посттрансферной редактирующей активности в ходе исследований, проведённых на этом ферменте [107]. Наконец, I263, I278, S280, I333 и G334 пространственно сближены с предполагаемым активным центром, а E218 находится в районе соединения редактирующего домена с синтетическим доменом фермента. Основное внимание при выборе аминокислотных остатков для сайт-направленного мутагенеза редактирующего

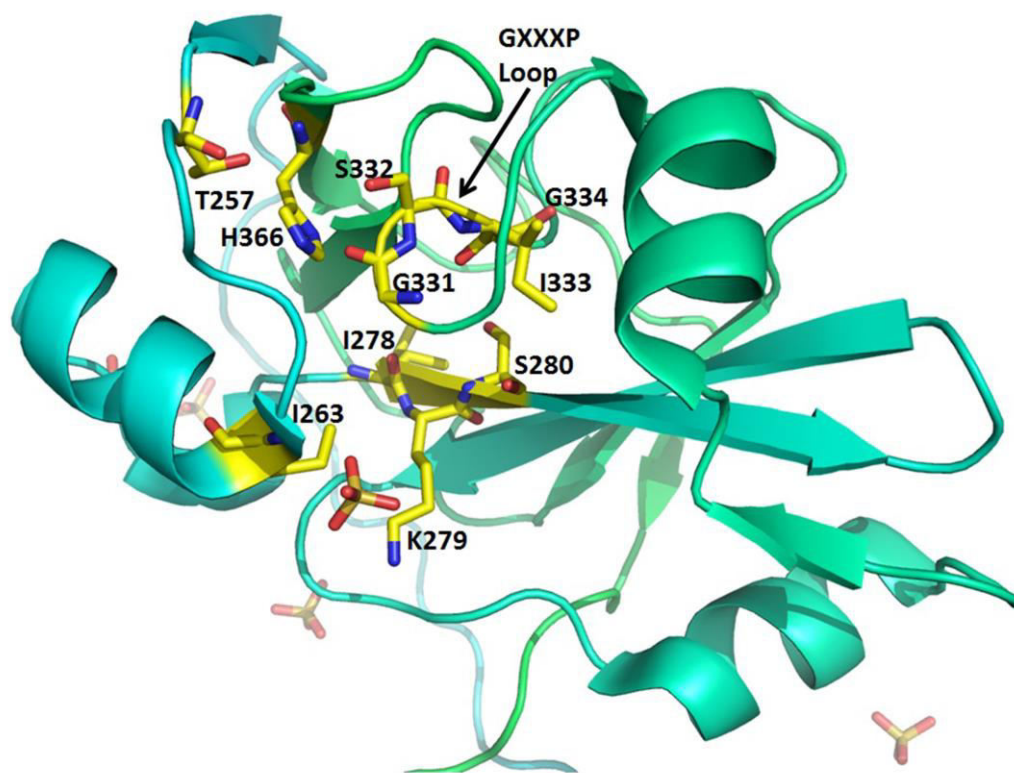


Рис. 3.17. Редактирующий домен ПроРСЕf. Обозначены номера аминокислотных остатков, подвергнутых замене на остатки аланина

домена ПроРС уделялось компьютерной модели комплекса тРНК^{Про} с ПроРС в конформации редактирования [52], а также эволюционной консервативности аминокислотных позиций.

3.3.2. Получение мутантных форм ПроРС*Ef*. Экспрессирующие векторы с мутантными последовательностями гена ПроРС*Ef* были получены путём сайт-направленного мутагенеза по методу QuikChangeTM (Stratagen, USA). Наличие нуклеотидных замен, ведущих к изменению значения кодона-мишени на кодон аланина, было подтверждено путём секвенирования. Мутантные белки были экспрессированы в клетках *E. coli* BL21(DE3) Star, и выделены из осветлённых лизатов ступенчатым высаливанием, ионообменной хроматографией на DEAE-сефарозе (рис. 3.18, *a*) и очищены путём обратного

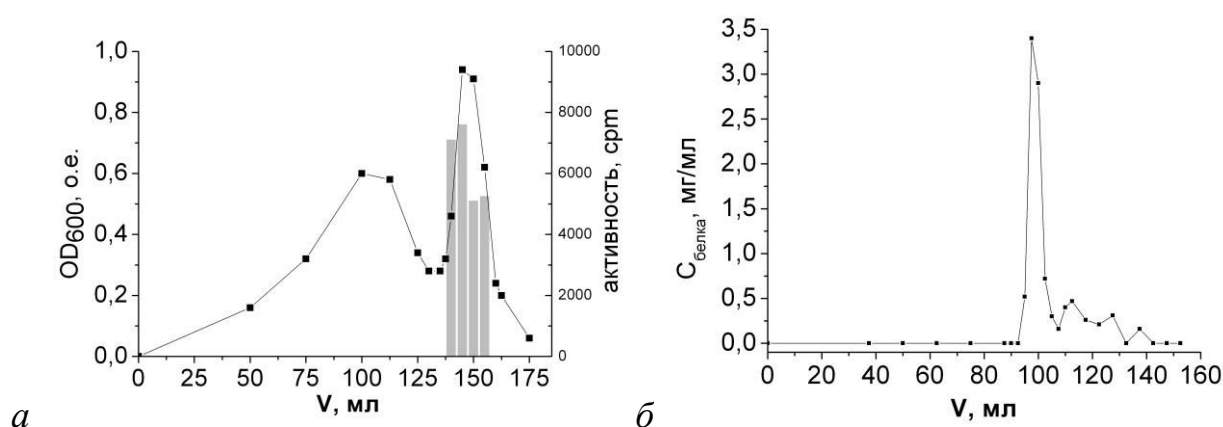


Рис. 3.18. *a*: хроматограмма выделения ПроРС*Ef* и её мутантных форм путём хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе. Гистограмма относится к правой оси и отражает относительную активность ПроРС по хроматографическим фракциям. *б*: хроматограмма очистки ПроРС*Ef* и её мутантных форм путём обратного высаливания на сорбенте Toyopearl HW60

высаливания на сорбенте Toyopearl HW60 (рис. 3.18, *б*). Чистота препаратов во всех случаях составила более 90% (рис. 3.19).

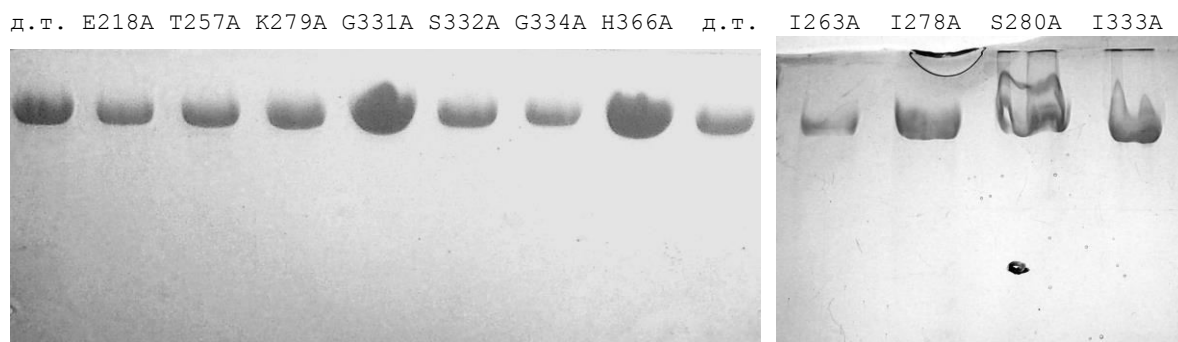


Рис. 3.19. Электрофореграмма препаратов ПроРСЕf дикого типа (д.т.) и её мутантных форм

3.3.3. Анализ посттрансферной редактирующей активности мутантных форм ПроРС. Химерную тРНК^{ПроАла} аминоацелировали радиоактивно-меченым аланином в присутствии АлаРС *T. thermophilus*. Активность мутантных форм пролил-тРНК синтетазы оценивали по скорости гидролиза меченой аланил-тРНК^{ПроАла}. Данные по начальной скорости реакции деацелирования показали, что из одиннадцати внесённых мутаций наибольшее влияние на посттрансферную редактирующую активность оказала замена K279A, ведущая к снижению активности примерно в 2000 раз. Мутантные формы ПроРСЕf I333A, I278A, G331A и H366A показали падение посттрансферной редактирующей активности, соответственно, в 55, 13, 7 и 4 раза по сравнению с диким типом фермента (табл. 3.2).

Помимо способности к деацелированию аланил-тРНК^{ПроАла}, была показана способность мутантной формы ПроРСЕf H366A к деацелированию пролил-тРНК^{Про}, аналогично ПроРСЕс с заменой H369A в гомологичной позиции [107] (рис. 3.20). Это свойство ПроРСЕf H366A было в дальнейшем использовано нами для получения модельной системы с целью изучения механизма посттрансферного редактирования.

Таблица 3.2

Деацилирование аланил-тРНК^{ПроАла} ПроРСЕf дикого типа (ДТ) и её мутантными формами

ПроРСЕf	ДТ	E218A	T257A	I263A	I278A	K279A
k_{obs}, c^{-1}	0,383± 0,047	0,249± 0,069	0,353± 0,069	0,157± 0,063	0,030± 0,005	1,909*10 ⁻⁴ ± 0,061*10 ⁻⁴
% от ДТ	100±12	65±18	92±18	41±16	8±1	5*10 ⁻⁴ ±2*10 ⁻³
Кратность снижения k_{obs}	1,0	1,5	1,1	2,4	12,8	2006,3

ПроРСЕf	S280A	G331A	S332A	I333A	G334A	H366A
k_{obs}, c^{-1}	0,188± 0,078	0,057± 0,028	0,364± 0,100	0,007± 0,005	0,172± 0,055	0,088± 0,039
% от ДТ	49±20	15±7	95±26	2±1	45±14	23±10
Кратность снижения k_{obs}	2,0	6,7	1,1	54,7	2,2	4,4

Мутантная форма ПроРСЕf K279A, характеризующаяся в наибольшей степени сниженной способностью к посттрансферному редактированию, была задействована в изучении претрансферного редактирования, описанном в

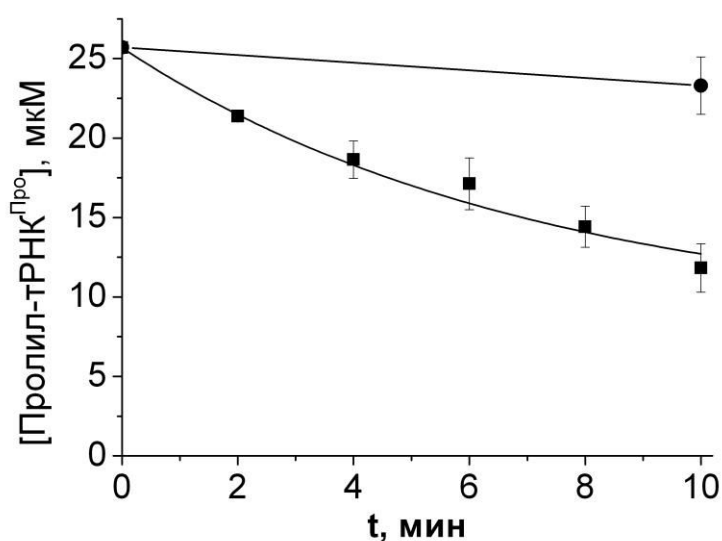


Рис. 3.20. Деацилирование пролил-тРНК^{Про} мутантной формой ПроРСЕf H366A (■) и её неферментативное деацилирование (●)

предыдущей главе. Эффект, достигнутый этой аминокислотной заменой, представлен на рис. 3.21, *а*, где разница концентраций мутантной формы и дикого типа фермента составляет до ста раз. При этом, ПроРСЕf K279A характеризуется несколько сниженной аминоацилирующей активностью (Рис 3.21, *б*), но сходной с диким типом претрансферной редактирующей активностью (рис. 3.11). Эти свойства мутантной формы позволили использовать её в качестве инструмента для изучения претрансферного редактирования.

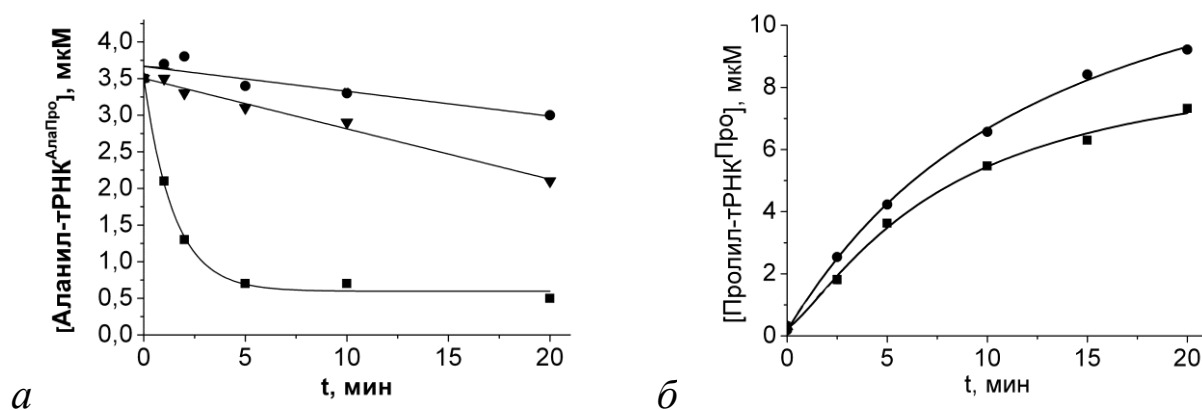


Рис 3.21. Биохимические свойства мутантной формы ПроРСЕf K279A: *а* – деацилирование аланил-тРНК^{ПроАла} 0,06 мкМ дикого типа ПроРСЕf (■) и её мутантной формой K279A в концентрациях 0,06 мкМ (●) и 6 мкМ (▼); *б* – аминоацилирование пролином тРНК^{Про}Rp (CGG) 20 нм ПроРСЕf дикого типа (●), и 0,2 мкМ её мутантной формы K279A (■)

Данные, полученные путём анализа влияния мутаций в редактирующем домене на скорость посттрансферного редактирования в целом согласуются с выдвинутыми ранее [52] предположениями о структуре деацилирующего активного центра ПроРСЕf, не подтверждая при этом роль сближенных с деацилирующим активным сайтом аминокислотных остатков T257 и S332. Гомологичные аминокислотным остаткам K279 и H369 ПроРСЕс аминокислотные остатки ПроРСЕf K279 и H366 имеют сходное с ними [107] значение для деацилирования аланил-тРНК^{ПроАла}, что могло бы

свидетельствовать в пользу относительного функционального сходства аппаратов посттрансферного редактирования ПроРС обеих бактерий, несмотря на их филогенетическую удалённость.

Выводы к подразделу 3.3.:

- Получены мутантные формы ПроРС*Ef* E218A, T257A, K279A, G331A, S332A, G334A, H366A, I263A, I278A, S280A, I333A.
- Наибольшее влияние на посттрансферную редактирующую активность оказала замена K279A, ведущая к снижению активности в 2006 раз.
- Мутантные формы ПроРС*Ef* I333A, I278A, G331A и H366A, проявили существенно сниженную посттрансферную редактирующую активность, составившую, соответственно, 2, 8, 15 и 23 % от активности дикого типа.
- Показана способность мутантной формы ПроРС*Ef* H366A к деацилированию пролил-тРНК^{Про}, аналогично ПроРС*Ec* с заменой H369A в гомологичной позиции.

Результаты исследований, приведённых в подразделе, опубликованы в работах:

1. Предполагаемый активный центр редактирующего домена пролил-тРНК синтетазы бактерии *Enterococcus faecalis* / Бояршин К.С., Крикливый И.А., Раевский А.В., Химин А.А., Яремчук А.Д., Тукало М.А. // Біополімери і клітина.-2009.-Т.25, № 1.-С. 39-43.
2. A new mechanism of post-transfer editing by aminoacyl-tRNA synthetases: catalysis of hydrolytic reaction by bacterial-type prolyl-tRNA synthetase / Boyarshin K.S., Priss A.E., Rayevskiy A.V., Ilchenko M.M., Dubey I.Y., Kriklivyi I.A.,

Yaremchuk A.D., Tukalo M.A. // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.- 2016.- DOI: 10.1080/07391102.2016.1155171.

4. Study on the structural basis of the bacterial-type prolyl-tRNA synthetase from *Enterococcus faecalis* editing activity by the methods of site directed mutagenesis / Boyarshin K.S., Yaremchuk G.D., Tukalo M.A. // Bridges in Life Sciences Annual Scientific Review Meeting, Zagreb, Croatia, October 4, 2008. Publisher: VARIMED Ltd. Budapest, Szalanci u 5, Hungary H-1124.

5. Pretransfer and posttransfer editing activity of prokaryote-type prolyl-tRNA synthetase of bacteria *Enterococcus faecalis* / Boyarshin K., Kriklyvi I., Yaremchuk G., Tukalo M. // VII Parnas conference on biochemistry and molecular biology. The Ukrainian biochemical journal. -2009. V. 81, N 4, P. 159.

6. tRNA-dependent editing of errors by aminoacyl-tRNA synthetases / Yaremchuk G., Kovalenko O., Boyarshin K., Kriklyvi I., Cusack S., Tukalo M. // VII Parnas conference on biochemistry and molecular biology. The Ukrainian biochemical journal. -2009. V. 81, N 4, P. 176.

7. Editing of errors by aminoacyl-tRNA synthetases in translation quality control / Tukalo M., Kovalenko O., Boyarshin K., Yaremchuk G., Kriklyvi I., Cusack S. // V International Symposium Supramolecular Systems in Chemistry and Biology, Kyiv, Ukraine, May 12-16, 2009, P. 42.

8. Structural basis of amino acid specificity maintenance by *Enterococcus faecalis* prolyl-tRNA synthetase / Boyarshin K., Kriklyvi I., Yaremchuk G., Tukalo M. // Conference of Young Scientists Biopolymers and Cell. -2010. -V.26, № 5., -P.416.

9. tRNA ensures amino acid specificity of enterococcal prolyl-tRNA synthetase on the two steps of editing / Boyarshyn K., Priss A., Rayevskiy A., Kriklyvi I., Kovalenko O., Il'chenko N., Dubey I., Yaremchuk A., Tukalo M. // 13th Young Scientists' Forum (3-6 July 2013 Saint Petersburg).

10. тРНК обеспечивает точность синтеза пролил-тРНК^{Pro} на двух этапах редактирования продукта / Бояршин К.С., Присс А.Е., Раевский А.В., Крикливый И.А., Коваленко О.П., Ильченко Н.Н., Дубей И.Я., Яремчук А.Д.,

Тукало М.А. // XI Український біохімічний конгрес (06-10 жовтня 2014 р. м. Київ). *Ukrainian biochemical journal*.-2014.-Vol.86, № 5 (Sup.1), P.16-17.

11. Редактирование пролил-тРНК синтетазой бактериального типа продуктов ошибочного узнавания аланина / Бояршин К.С., Присс А.Е., Раевский А.В., Крикливый И.А., Коваленко О.П., Ильченко Н.Н., Дубей И.Я., Яремчук А.Д., Тукало М.А. // 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века», (20–24 апреля 2015 года, Пущино). Сб. тезисов, с.220.

3.4. Изучение роли тРНК^{Про} в посттрансферном редактировании методом модификации тРНК

Сопоставление данных по редактирующей активности мутантных форм ПроРС с компьютерной моделью комплекса Ала-тРНК^{Про} и ПроРС*Ef* в конформации посттрансферного редактирования [52] не позволило прояснить механизм гидролиза аланил-тРНК^{Про} в активном центре редактирующего домена. Дополнительным кандидатом на активную роль в этом процессе стала 2'-ОН группа А76 аланил-тРНК^{Про}.

Для изучения роли 2'-ОН группы тРНК^{Про} в посттрансферном редактировании нами были использованы две различные экспериментальные модели. В одной из них использовалась гибридная тРНК^{ПроАла} и её способность быть аминоацилированной аланином при помощи АлаРС. Во второй использовалось свойство мутантной формы ПроРС Н366А деацилировать пролил-тРНК^{Про} путём посттрансферного редактирования.

3.4.1. Модификация А76 тРНК^{ПроАла} по 2'-положению рибозы. Для изучения роли тРНК в посттрансферном редактировании ПроРС ферментативным путём было получено 2'-dA76 производное тРНК^{ПроАла}. Для этого препарат тРНК^{ПроАла} был подвергнут обработке фосфодиэстеразой *S. adamanteus*, что привело к отщеплению её одноцепочечного 3'-конца 74-ССА-

76. Затем эта последовательность была достроена при помощи терминальной тРНК-нуклеотидилтрансферазы *B. stearothermophilus* в присутствии ЦТФ и 2'-dATФ. Полученная таким образом 2'-dA76 тРНК^{ПроАла} была очищена путём электрофореза в ПААГ. После элюции тРНК из геля, чистота полученного препарата контролировалась по электрофореграмме, с использованием прибора для секвенирующего электрофореза (BioRad, США).

3.4.2. Биохимические свойства 2'-dA76 аланил-тРНК^{ПроАла}.

Полученный препарат был аминоацелирован аланином при помощи АлаРС *E. faecalis*. Полученная 2'-dA76 аланил-тРНК^{ПроАла} полностью теряла способность к деацелированию в присутствии ПроРС (рис. 3.22, а). Более того, она оказывалась защищена ферментом от спонтанного гидролиза. Последний факт свидетельствует в пользу эффективного связывания субстрата с активным центром редактирующего домена. Существенно сниженной оказалась также скорость распада модифицированной аланил-тРНК^{ПроАла} в отсутствие фермента (рис. 3.22, б). Таким образом, полученные данные продемонстрировали

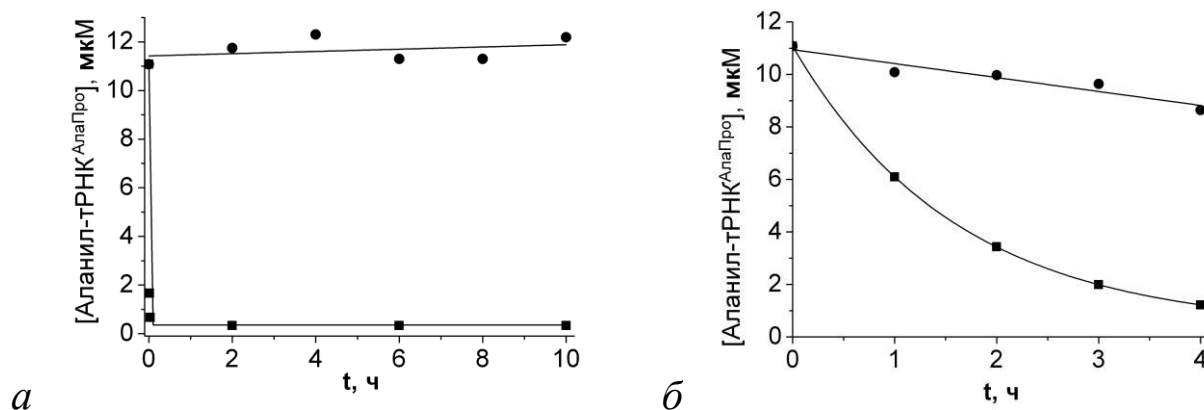


Рис 3.22. Биохимические свойства 2'-dA76 аланил-тРНК^{ПроАла}: а – деацелирование аланил-тРНК^{ПроАла} (■) и 2'-dA76 аланил-тРНК^{ПроАла} (●) в присутствии 4,8 мкМ ПроРСЕf в течение 10 часов; б – неферментативное деацелирование аланил-тРНК^{ПроАла} (■) и 2'-dA76 аланил-тРНК^{ПроАла} (●)

критическую роль 2'-ОН А76 в редактировании аланил-тРНК^{ПроАла} ПроРСЕf, однако оставили под вопросом её каталитическую функцию, так как не

представлялось возможным экспериментально определить кинетические параметры реакции. Защита субстрата от неферментативного гидролиза может свидетельствовать о потере доступа к ангидридной связи воды, без которой реакция невозможна даже при сохранении всех каталитических групп.

3.4.3. Модификация А76 тРНК^{Pro} по 2'-положению рибозы. Для получения более информативных данных относительно роли 2'-ОН А76 тРНК в механизме гидролиза аланил-тРНК^{Pro}, мы использовали способность мутантной формы ПроРСЕf Н366А деацилировать пролил-тРНК^{Pro} [107]. В реакциях были использованы пролил-тРНК^{Pro} дикого типа, 2'-dА76 пролил-тРНК^{Pro} и 2'-FА76 пролил-тРНК^{Pro} (рис. 3.23).

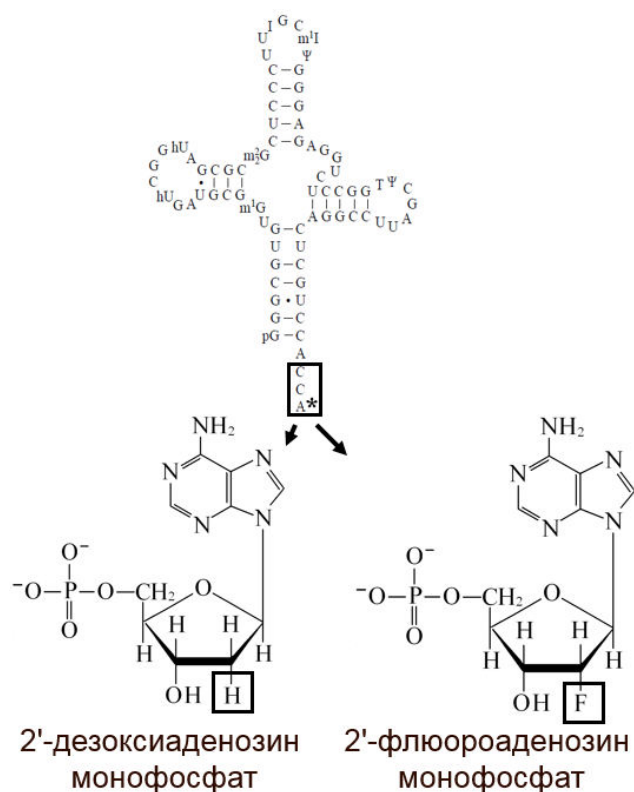


Рис. 3.23. Замена А76 тРНК^{Pro}*Rp* на 2'-дезоксиаденозин и 2'-флюороаденозин

Препараты модифицированных тРНК были получены ферментативным путём. Для этого препарат тРНК^{Pro}*Rp* (CGG) был подвергнут обработке фосфодиэстеразой *S. adamanteus*, что привело к отщеплению её одноцепочечного 3'-конца 74-ССА-76. Затем эта последовательность была

достроена при помощи терминальной тРНК-нуклеотидилтрансферазы *B. stearothermophilus* в присутствии ЦТФ и, в одном случае 2'-dATФ, в другом 2'-F АТФ. Полученные таким образом 2'-dA76 -тРНК^{Про} и 2'-FA76 тРНК^{Про} были очищены путём электрофореза в ПААГ.

3.4.4. Биохимические свойства 2'-dA76 пролил-тРНК^{Про} и 2'-FA76 пролил-тРНК^{Про}. В экспериментах по деацилированию 2'-dA76 пролил-тРНК^{Про} и 2'-FA76 пролил-тРНК^{Про} ПроРСЕf Н366А не наблюдалось эффекта защиты производных аминоксил-тРНК от спонтанного гидролиза (рис. 3.24, а), и стало возможным провести количественную оценку кинетики гидролиза продуктов (рис. 3.24, б; табл. 3.3). Как видно из представленных результатов, скорость гидролиза 2'-d-A76 пролил-тРНК^{Про} была приблизительно в 600 раз меньше скорости гидролиза пролил-тРНК^{Про}.

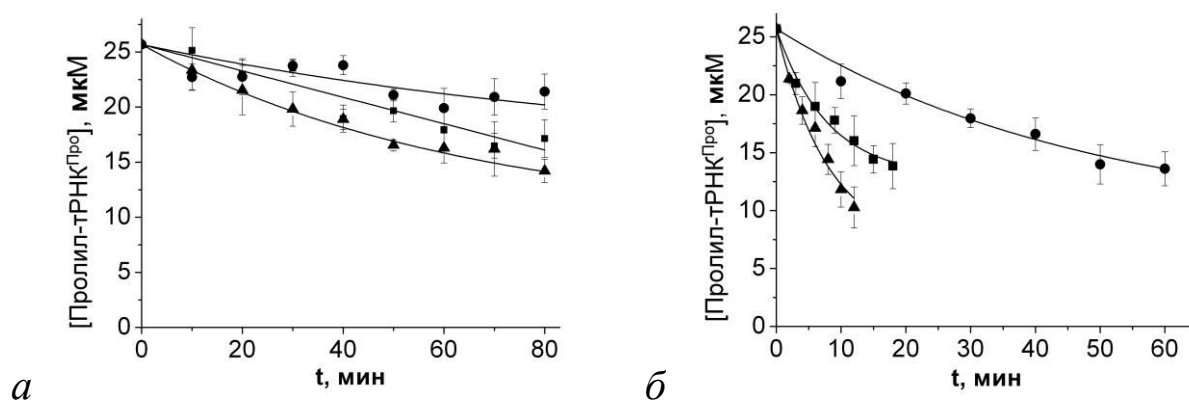


Рис. 3.24. Деацилирование дикого типа пролил-тРНК^{Про} (▲) и её производных 2'-FA76 пролил-тРНК^{Про} (■) и 2'-dA76 пролил-тРНК^{Про} (●) в отсутствие фермента (а), и в присутствии мутантной формы ПроРСЕf Н366А (б)

При этом ферментативный гидролиз 2'-dA76 пролил-тРНК^{Про} идёт в 8 раз быстрее неферментативного. Таким образом, несмотря на сохранение доступа воды к ангидридной связи, удаление 2'-ОН коренным образом сказалось на каталитической функции редактирующего домена. Скорость гидролиза 2'-FA76

пролил- тРНК^{Про} оказалась сниженной по сравнению с диким типом пролил-тРНК^{Про} приблизительно в 140 раз (табл. 3.3). Несмотря на свои полярные

Таблица 3.3

**Деацилирование дикого типа пролил-тРНК^{Про}
и её производных ПроРСЕf H366A**

		Дикий тип пролил-тРНК ^{Про}	2'-F A76	2'-d A76
Ферментативный гидролиз	k_{obs}, c^{-1}	$0,246 \pm 0.037$	$0,175 * 10^{-2}$ $\pm 0,024 * 10^{-2}$	$0,422 * 10^{-3}$ $\pm 0,052 * 10^{-3}$
	%	100,0	$7,1 * 10^{-1}$	$1,7 * 10^{-1}$
Неферментативный гидролиз	k_{obs}, c^{-1}	$0,166 * 10^{-3}$ $\pm 0,037 * 10^{-3}$	$0,964 * 10^{-4}$ $\pm 0,174 * 10^{-4}$	$0,503 * 10^{-4}$ $\pm 0,080 * 10^{-4}$
	%	100,0	58,1	30,3

свойства, флюорогруппа в 2'-положении оказалась неспособной имитировать функции гидроксила. Наиболее очевидным отличием этих химических заместителей является неспособность флюорогруппы быть донором водородной связи [56]. Таким образом, можно предположить, что функция 2'-гидроксильной группы в посттрансферном редактировании осуществляется посредством образования ею водородной связи с некой отрицательно заряженной группой и создания определенной конформации субстрата, которая приводит к значительному ускорению гидролиза эфирной связи.

Выводы к подразделу 3.4.:

- Получены препараты производных аминоксил-тРНК: 2'-dA76 аланил-тРНК^{ПроАла}, 2'-dA76 пролил-тРНК^{Про}, 2'-FA76 пролил-тРНК^{ПроАла}.

- Модификация 2'-dA76 аланил-тРНК^{ПроАла} ведёт к подавлению посттрансферного редактирования субстрата ПроРСЕf, и существенно замедляет его неферментативный гидролиз.
- В экспериментальной модели на основе мутантной формы ПроРСЕf H366A 2'-dA76 производное пролил-тРНК^{Про} характеризуется скоростью деацилирования в ходе посттрансферного редактирования, сниженной более чем в 500 раз.
- В экспериментальной модели на основе мутантной формы ПроРСЕf H366A 2'-флюорогруппа A76 производного пролил-тРНК^{Про} не компенсирует отсутствие 2'-гидроксильной группы, что может свидетельствовать о роли 2'-гидроксильной группы как донора водородной связи в механизме катализа деацилирования аланил-тРНК^{Про}.

Результаты исследований, приведённых в подразделе, опубликованы в работах:

1. A new mechanism of post-transfer editing by aminoacyl-tRNA synthetases: catalysis of hydrolytic reaction by bacterial-type prolyl-tRNA synthetase / Boyarshin K.S., Priss A.E., Rayevskiy A.V., Ilchenko M.M., Dubey I.Y., Kriklivyi I.A., Yaremchuk A.D., Tukalo M.A. // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.- 2016.- DOI: 10.1080/07391102.2016.1155171.
2. tRNA ensures amino acid specificity of enterococcal prolyl-tRNA synthetase on the two steps of editing / Boyarshyn K., Priss A., Rayevskiy A., Kriklivyi I., Kovalenko O., Il'chenko N., Dubey I., Yaremchuk A., Tukalo M. // 13th Young Scientists' Forum (3-6 July 2013 Saint Petersburg).
3. тРНК обеспечивает точность синтеза пролил-тРНК^{Про} на двух этапах редактирования продукта / Бояршин К.С., Присс А.Е., Раевский А.В., Крикливый И.А., Коваленко О.П., Ильченко Н.Н., Дубей И.Я., Яремчук А.Д.,

Тукало М.А. // XI Український біохімічний конгрес (06-10 жовтня 2014 р. м. Київ). *Ukrainian biochemical journal*.-2014.-Vol.86, № 5 (Sup.1), P.16-17.

4. Редактирование пролил-тРНК синтетазой бактериального типа продуктов ошибочного узнавания аланина / Бояршин К.С., Присс А.Е., Раевский А.В., Крикливый И.А., Коваленко О.П., Ильченко Н.Н., Дубей И.Я., Яремчук А.Д., Тукало М.А. // 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века», (20–24 апреля 2015 года, Пущино). Сб. тезисов, с.220.

РАЗДЕЛ 4

АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы основывались на редукционной методологии, используя изучение влияния отдельных элементов системы на результат происходящих в ней процессов для выдвижения обоснованных предположений о механизме работы системы как целого, путём сопоставления полученных нами экспериментальных данных с результатами теоретических вычислений. При этом часть работы, посвящённая претрансферному редактированию, описывает феноменологию процесса методами ферментативной кинетики, и не претендует на раскрытие его механизма в целом, демонстрируя лишь некоторые его элементы. В части работы, посвящённой посттрансферному редактированию, осуществлена идентификация ключевых структурных элементов, и предложено экспериментальное обоснование теоретической модели механизма этого процесса.

4.1 Претрансферное редактирование ПроРС *E. faecalis*

Осуществляемое ПроРС*Ef* тРНК-зависимое претрансферное редактирование представляет собой относительно небольшой, но статистически достоверный эффект, самостоятельный по отношению к процессам активации аминокислоты, её переноса на тРНК, и селективного высвобождения аланил-аденилата. При этом, вопрос о его физиологическом значении *in vivo* остаётся открытым. Наблюдаемый нами эффект может отражать как актуальный механизм, задействованный в обеспечении точности синтеза пролил-тРНК^{Pro}, так и рудимент механизма, имевшего значение в живой клетке до появления эффективного посттрансферного редактирования.

И тРНК-зависимое, и тРНК-независимое претрансферное редактирование ПроРС*Ef* являются каталитическими процессами, скорость которых многократно превышает скорость неферментативного гидролиза аланил-аденилата в растворе (табл. 3.1). Несмотря на это, селективное высвобождение аланил-аденилата имеет место – оно частично происходит в отсутствие тРНК^{Про} (рис. 3.10). Параллельно с высвобождением ошибочно синтезированного продукта происходит его вторичное связывание и гидролиз в активном центре фермента (рис. 3.11). Равновесие между этими процессами, а также неферментативным гидролизом аланил-аденилата, определяет стабильно низкую концентрацию последнего в реакционной смеси. В присутствии нативной тРНК^{Про} накопления аланил-аденилата в смеси не происходит, и его концентрация не превышает концентрацию активных центров фермента (рис. 3.10). При добавлении тРНК в реакционную смесь, содержащую аланил-аденилат, его концентрация быстро падает, что отражает ускорение его гидролиза ПроРС*Ef* (рис. 3.11). Этот результат указывает на участие тРНК^{Про} именно в гидролизе аланил-аденилата, а не в его синтезе, что также могло бы отразиться на скорости накопления АМФ в эксперименте. Кинетика гидролиза аланил-аденилата в присутствии тРНК^{Про} сходна для дикого типа ПроРС и мутантных форм, несущих повреждённый активный центр редактирующего домена, что свидетельствует в пользу непричастности механизма посттрансферного редактирования к этому процессу.

Эффективная индукция претрансферного редактирования невозможна в отсутствие 2'-гидроксильной группы рибозы А76 тРНК^{Про}. Удаление этой группы оказывает существенно большее влияние на индукцию редактирования, чем на скорость аминоацилирования модифицированной тРНК^{Про}. Следовательно, роль 2'-ОН, по-видимому, не ограничивается связыванием А76 в активном центре ПроРС*Ef*, или индукцией конформационных изменений, одинаково важных для редактирования и аминоацилирования. Таким образом, этой химической группе с большой долей уверенности можно приписать

специфическую функцию запуска каталитического механизма гидролиза аланил-аденилата в ходе тРНК-зависимого претрансферного редактирования.

Сравнивая полученные нами результаты с результатами Сплан и соавторов, полученными на ПроРСЕс и показавшими отсутствие у неё тРНК-зависимости претрансферного редактирования [46], необходимо отметить применение зарубежной группой учёных тРНК^{Pro}, лишённой 5'-концевого цитозина, что упростило получение транскрипта при помощи ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага T7 [124]. Эта мера ведёт к укорочению двуспирального акцепторного стебля, и, соответственно, к удлинению одноцепочечного участка тРНК^{Pro}, что, в свою очередь, может сказываться на позиционировании A76 в активном центре фермента. Способность делеционной формы тРНК^{Pro} к аминоацилированию сама по себе не снимает вопрос о позиции не участвующей в этом процессе 2'-гидроксильной группы, которая в наших экспериментах показала своё ключевое значение для индукции претрансферного редактирования. Возможно, этим и объясняется отсутствие эффекта в экспериментах Сплан и соавторов [46]. Также необходимо отметить филогенетическую удалённость *E. coli* (тип *Proteobacteria*) и *E. faecalis* (тип *Firmicutes*). В условиях наличия эффективного посттрансферного редактирования, механизм претрансферного редактирования, в частности тРНК-зависимость, может не стабилизироваться отбором в достаточной мере для его сохранения у всех ПроРС бактериального типа.

Наши результаты совпадают с полученными Сплан и соавторами на ПроРСЕс, свидетельствующими о доминировании каталитического тРНК-независимого претрансферного редактирования над избирательным высвобождением аланил-аденилата [46]. При этом, исследованный нами фермент способен демонстрировать целый спектр эффектов, направленных на устранение последствий ошибок: это и селективное высвобождение аланил-аденилата, и его тРНК-независимый гидролиз, тРНК-зависимый гидролиз, посттрансферное редактирование аланил-тРНК^{Pro} *in cis* и *in trans*, деацилазами ProX [37], PrdX [35] и YbaK (в случае цистеинил-тРНК^{Pro}) [36; 99]. При этом,

по крайней мере в эксперименте, аланил-аденилат и аланил-тРНК^{Pro} могут подвергаться редактированию в том числе при вторичном улавливании из раствора. Перечисленные процессы, различные по эффективности, должны в значительной мере отражать эволюционную историю повышения специфичности синтеза пролил-тРНК^{Pro}. Существование ПроРС, не располагающих редактирующим доменом у архей, эукариот и части бактерий [52], как и существование обособленных деацилаз, гомологов редактирующего INS-домена, можно рассматривать как признак относительно раннего появления и высокого в прошлом значения претрансферного редактирования. Обсуждая причины развития посттрансферного редактирования на примере ИлеРС, Дулик и соавторы [125] акцентировали внимание на сложности параллельной оптимизации аминоацилирующей и претрансферной редактирующей активностей в аминоацилирующем активном центре.

ПроРС*Ef* стала первой АРСазой второго структурного класса, у которой была обнаружена способность к тРНК-зависимому претрансферному редактированию. Ранее было показано, что влияние тРНК на посттрансферное редактирование у АРСаз первого структурного класса зависит от скорости переноса активированного аминокислотного остатка на тРНК [50; 126], что ожидаемо с точки зрения соотношения скоростей аминоацилирования тРНК и гидролиза аминоацил-аденилата. При этом, какие-либо структурные данные о механизме участия тРНК в претрансферном редактировании на сегодняшний день отсутствуют. Нет оснований и для каких-либо предположений о степени общности таких механизмов у АРСаз первого класса и ПроРС*Ef*. При этом, как и в случае ИлеРС *E. coli* [125], ПроРС*Ef* при инактивации редактирующего домена сохраняет примерно треть скорости тРНК-зависимого редактирования по данным теста на накопление АМФ. Таким образом, насколько можно судить исходя из полученных данных, эти эффекты сравнимы по масштабу и потенциальному физиологическому значению. При этом, по-видимому, в обоих случаях основную роль в поддержании точности трансляции играет посттрансферное редактирование.

4.2. Посттранскрипционное редактирование ПроРС *E. faecalis*

4.2.1. Сопоставление экспериментальных данных с данными компьютерного моделирования. Чтобы расширить возможности интерпретации экспериментальных данных, полученных в результате сайт-направленного мутагенеза аминокислотных остатков редактирующего домена ПроРС и модификации субстратов редактирования, мы сопоставили их с результатами компьютерного моделирования комплекса ПроРС*Ef* с аланил-тРНК^{Pro}, связанной в редактирующем активном центре. Данная модель была получена сотрудниками отдела синтетических биорегуляторов Института молекулярной биологии и генетики Национальной академии наук Украины, и представлена в совместной публикации с автором настоящей работы [127]. Она опирается на полноразмерную кристаллическую структуру ПроРС*Ef* [52] и отличается от представленной в литературе модели Кумара и соавторов, представляющей лишь часть субстрата, 5'-ССА-Ала, связанную со свободным доменом INS [2; 109]. Для моделирования механизма реакции деацилирования аланил-тРНК^{Pro} ПроРС*Ef* были использованы квантово-химические методы в сочетании с молекулярной динамикой.

В представленной модели [127] (рис. 4.1 *а, б*) карман, в котором расположен активный центр, в значительной мере перекрывается с предполагаемым активным центром, описанным ранее у Крепина и соавторов [52], включая такие функционально важные элементы, как мотив 331-ГлиXXXФен-335 и Лиз279. При этом Лиз279 связан с фосфатной группой А76 аланил-тРНК^{Pro}. Это взаимодействие соответствует результатам рентген-структурного анализа апофермента, где остаток лизина координирует сульфат-ион [52].

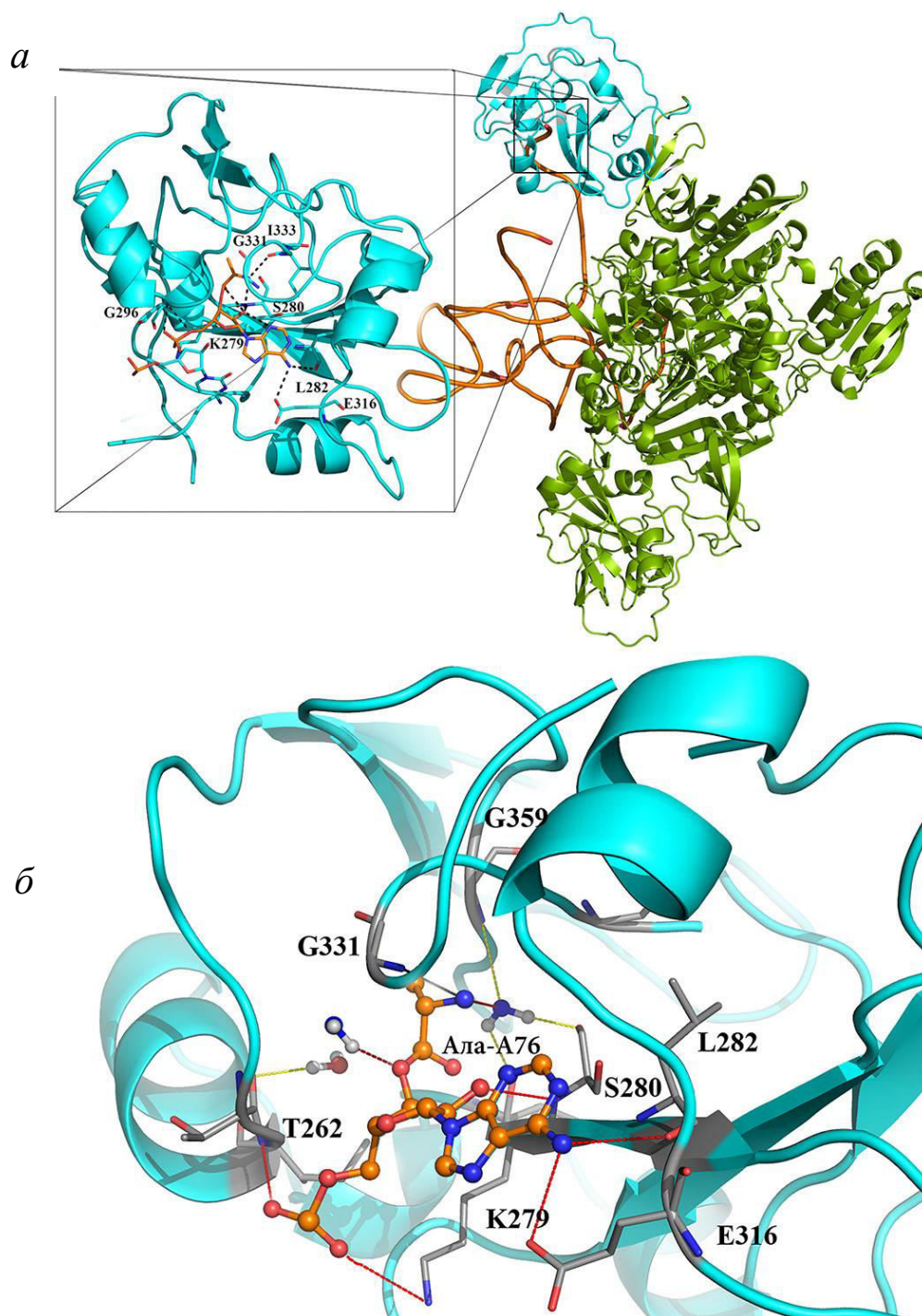


Рис. 4.1. *a* – стабильная структура комплекса аланил-тРНК^{Про} и ПроPCEf в конформации редактирования; *b* – то же, крупным планом

Лиз279 взаимодействует также с O2 C75 и 2'-гидроксильной группой C74, способствуя изгибу ССА-конца тРНК. В другое стабильное взаимодействие между редактирующим доменом ПроPCEf и субстратом

вовлечён аденин A76. Это азотистое основание также вступает в стекинг с Фен330.

Остаток аланина Ала-тРНК^{Про} связан в гидрофобном кармане редактирующего домена. Его фиксируют взаимодействия аминогруппы с основной цепью Гли331 и Иле333 (остатками мотива 331-ГлиXXXФен-335). Боковая метильная группа остатка аланина находится в гидрофобном кармане, ранее показанном Кумаром и соавторами [109], и включающем Иле263, Иле277, Гис366 и Вал266 [127].

Расчёт молекулярной динамики комплекса ПроPCEf с аланил-тРНК^{Про} в конформации редактирования позволил установить, что водородные связи между аминокислотными остатками редактирующего домена и субстратом следует рассматривать как долгоживущие. Также были определены молекулы воды, соседствующие с углеродом карбонильной группы субстрата. Затем были выбраны кадры молекулярной динамики, где две молекулы воды формировали углы 104-105° на расстоянии 3.5 Å от углерода карбонильной группы. Подобные конфигурации сохранялись на протяжении 50 пс, в то время как остаток аланина также находился в удобном для атаки положении [127]. Исходя из этого, две молекулы воды, положение которых было предсказано на основании расчётов молекулярной динамики, были включены в подсистему, в пределах которой в дальнейшем проводились квантово-механические расчёты.

Координаты атомов для полной оптимизации геометрии были взяты из молекулярной динамики при t=2050 пс считая с её начала. В этот момент конформация активного центра и пространственное распределение молекул воды допускает формирование пре-реакционного комплекса, с которого может начаться процесс гидролиза [127] (рис. 4.2). Согласно визуализированным квантово-механическим моделям, гидролиз аланил-тРНК^{Про} включает одно переходное состояние. В реакции напрямую участвуют две молекулы воды. Несколько аминокислотных остатков фермента способствуют гидролизу [127].

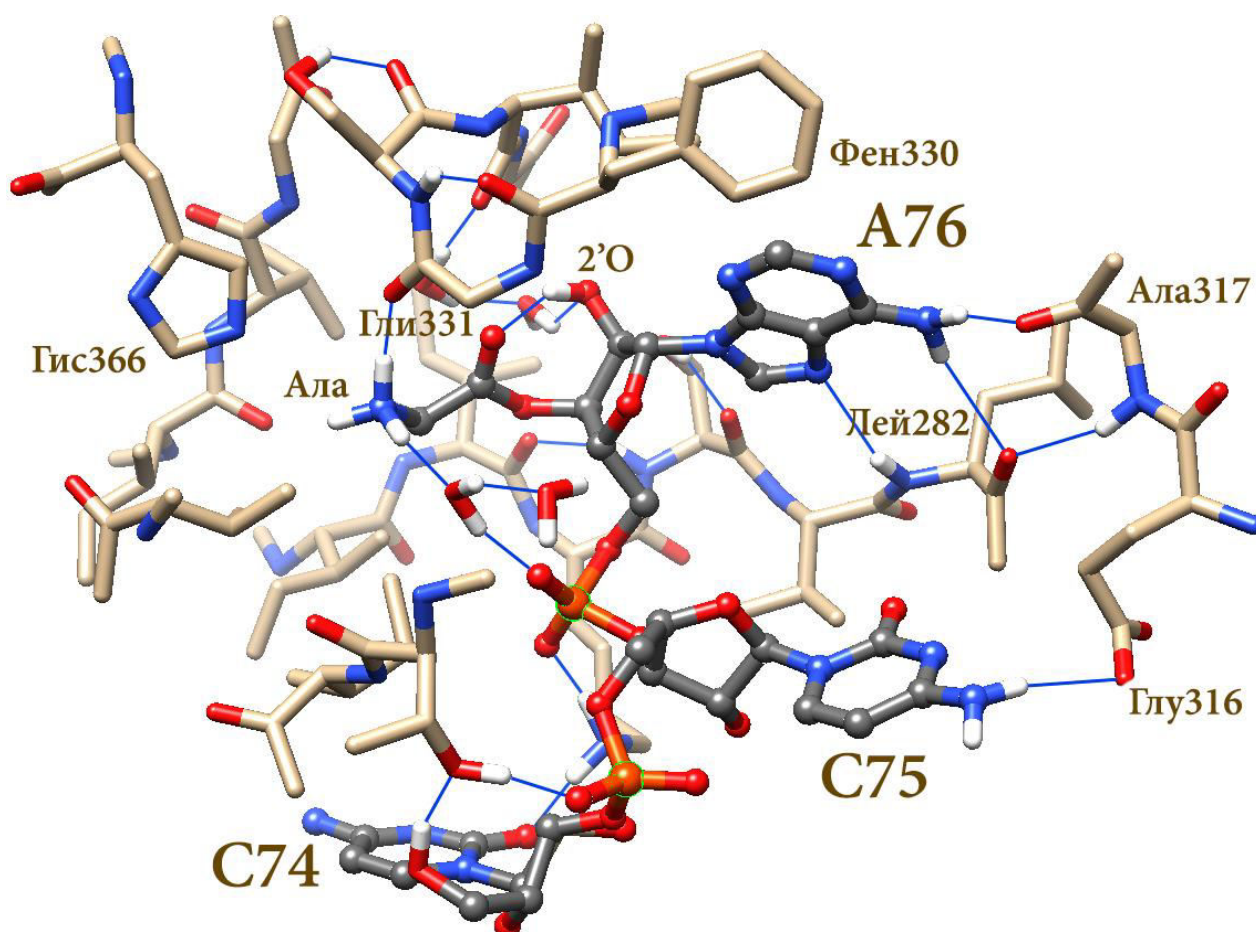


Рис. 4.2. Участок структуры комплекса редактирующего домена ПроPCEf и аланил-тРНК^{Ала}, для которого проводились квантово-механические расчёты. Атомы водорода скрыты, кроме групп, образующих водородные связи, и молекул воды

Ключевая роль 2'-гидроксильной группы рибозы А76 тРНК^{Про} в отщеплении остатка аланина полностью подтверждается вычислениями. Процесс предполагает формирование внутримолекулярной водородной связи между 2'-ОН и карбонильной группой аминокислоты. Для достижения этого 2'-гидроксильная группа и аминокислотный остаток в 3'-положении поворачиваются до приобретения конформации, в которой гидроксильная группа способна координироваться карбонильной группой аминокислотного остатка (рис 4.3, а). Это взаимодействие повышает электрофильность углерода карбонильной группы и, таким образом, существенно способствует нуклеофильной атаке молекулы воды [127].

Две молекулы воды сближаются с карбонильной группой остатка аланина. Одна из них (W1) готова к нуклеофильной атаке на электрофильную карбонильную группу. Эта молекула воды образует водородную связь с карбонильным кислородом основной цепи Иле333 и со второй, не атакующей молекулой воды (W2). Молекула W2, в свою очередь, образует водородную связь с карбонильным кислородом основной цепи Иле278. Координирование протона атакующей воды карбонильной группой Иле333 сохраняется в ходе атаки. Таким образом формируется предреакционный комплекс (Рис 4.3, а) [127].

Протонированная аминогруппа остатка аланина (NH_3^+) образует две водородные связи: одну с карбонильной группой Гли331, другую с молекулой воды W3, координирующей, в свою очередь, анион фосфата. Таким образом, вода образует мостик между фосфатной группой и аминогруппой. Вода W3 не участвует напрямую в химических реакциях. Далее она не будет упоминаться в настоящей работе, однако, следует отметить, что её координирующая роль остаётся неизменной в течение всего процесса гидролиза ангидридной связи. Отщепляемый остаток аланина конформационно зафиксирован сетью водородных связей, оставляющей ему минимум свободы движений, что, по-видимому, облегчает гидролиз [127].

Молекула воды W1 атакует карбонильную группу остатка аланина. При этом формируется связь С-ОН, в то время как второй протон воды W1 одновременно начинает переноситься на W2, формируя с ней связь Н-О. Таким образом достигается переходное состояние (ПС) (Рис 4.3, б, в) [127]. В это время неатакующая молекула воды W2 координирует аминокислотные остатки Иле278 и Сер280 – один протон образует водородную связь с гидроксильной группой серина, другой с карбонильной группой основной цепи изолейцина. Таким образом, эта молекула воды фиксируется, что важно для последующих этапов реакции. Тогда же протонированная аминогруппа отщепляемого остатка аланина образует третью водородную связь – с азотом гетероцикла Гис366. Тройное координирование аминогруппы остатка аланина водой, Гли331 и

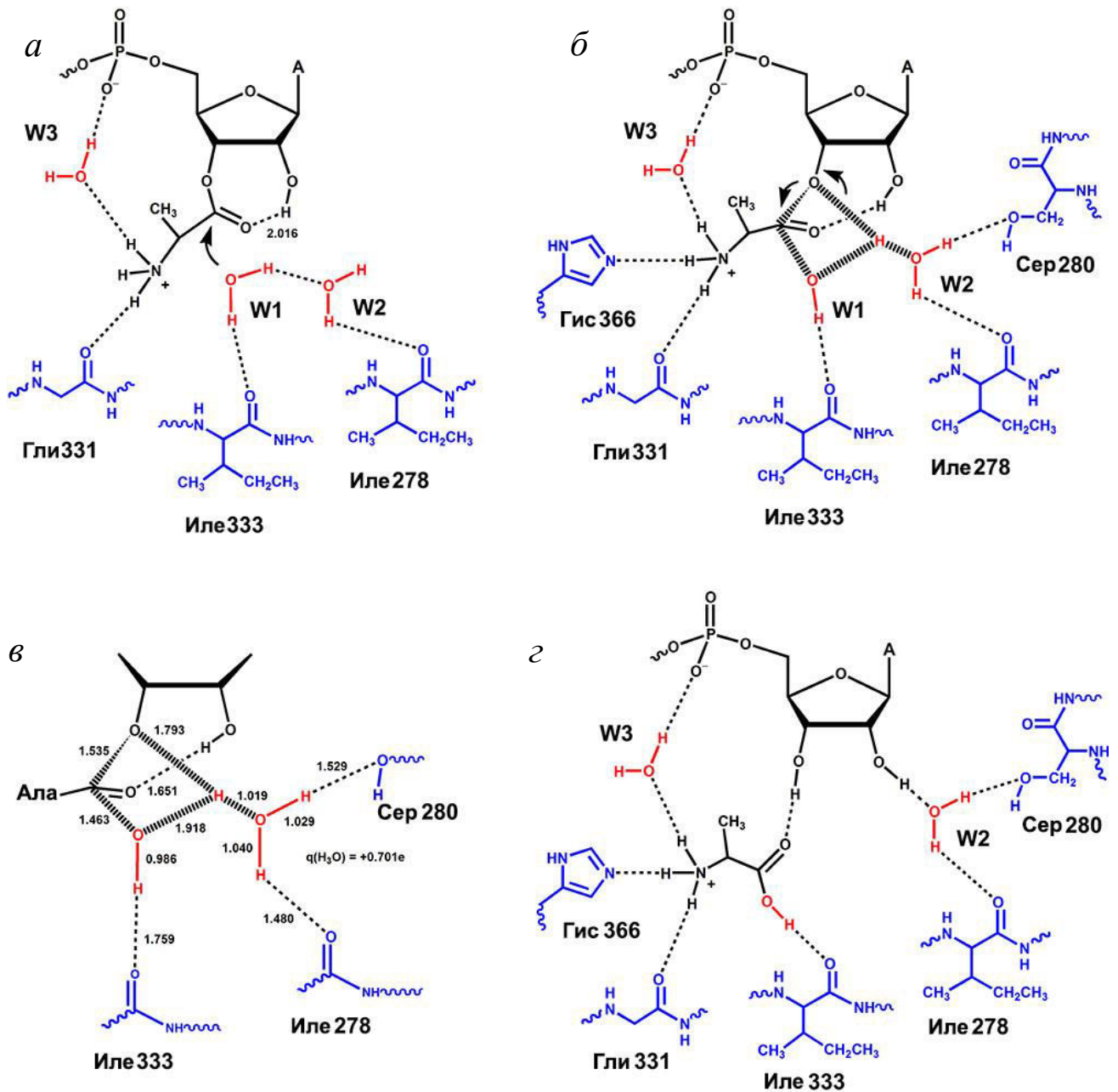


Рис. 4.3 Механизм посттрансферного редактирования аланил-тРНК^{Про} ПроPCEf: *а* – предреакционный комплекс, стрелкой показано направление нуклеофильной атаки молекулы воды по карбонильному углероду гидролизуемого остатка аланина, пунктирными линиями – водородные связи; *б*– переходное состояние, стрелки показывают образование и разрыв химических связей; *в* – параметры переходного состояния, числами показаны длины химических связей, $q(\text{H}_3\text{O}^+)$ – полный заряд на ионе гидроксония; *г* – продукты реакции.

Гис366 остаётся стабильным до конца процесса [127].

Депротонированная атакующая молекула воды, то есть анион гидроксида, соединяется с карбоксильной группой отщепляемого остатка аланина, формируя связь С-ОН с тетраэдральным атомом углерода. Вторая молекула воды W2 протонируется, и в определённый момент образует ион гидроксония H_3O^+ , скоординированный водородной связью с гидроксильной группой бывшей W1. Таким образом, через W2 происходит перенос протона с W1 на 3'-атом кислорода остатка рибозы, с формированием 3'-гидроксильной группы. В то же время разрывается связь между 3'-кислородом и карбонильной группой отщепляемой аминокислоты. Гидроксильная группа в составе карбоксильной группы аланина остаётся связанной с карбонильной группой основной цепи аминокислотного остатка Иле333 водородной связью. Во время переноса протона W2 продолжает связываться остатками Иле278 и Сер280 [127].

В конце переходного состояния осуществляется разъединение остатков рибозы и аланина. При этом тРНК^{Про} оказывается свободна от аминокислоты (Рис 4.3, *г*), протонированная аминогруппа которой в этот момент всё ещё координируется молекулой воды W3, а также аминокислотными остатками активного центра Гли331 и Гис366. Карбоксильная группа аланина образует две водородных связи – гидроксильная группа в её составе всё ещё координируется Иле333, в то время как карбонильный кислород формирует новую водородную связь с вновь сформированной 3'-гидроксильной группой остатка рибозы. Молекула воды W2, после передачи протона с W1 на 3'-атом кислорода остатка рибозы, остаётся связанной с аминокислотными остатками Иле278 и Сер280 водородными связями. Кислород воды в то же время формирует новую водородную связь с 2'-гидроксильной группой остатка рибозы. Далее молекула аланина покидает активный центр редактирующего домена [127].

Согласно проведённым расчётам, модификации А76 аланил-тРНК^{Про} по 2'-положению, с введением в её структуру вместо 2'-гидроксильной группы атома фтора или протона, существенно повышают энергию активации переходного состояния (табл. 4.1) [127].

Таблица 4.1

Энергетические параметры реакции гидролиза аланил-тРНК^{Про} для систем, содержащих в положении 76 аденозин, 2'-флюороаденозин и 2'-дезоксаденозин

2'-заместитель	Энергия активации, ккал/моль ^{1.}	
	E_{act}	ΔE_{act} ^{2.}
ОН	18.57	0
Н	31.06	12.49
F	25.73	7.16

Примечания:

1. Разница между полными энергиями пре-реакционного комплекса и переходного состояния.
2. Разница между энергиями активации аланил-тРНК^{Про} дикого типа и её соответствующими производными.

Суммируя рассмотренные данные, следует подчеркнуть, что согласно им внутримолекулярное взаимодействие 2'-гидроксильной группы А76 аланил-тРНК^{Про} с карбонильной группой остатка аланина повышает электрофильность углерода карбонильной группы, и, таким образом, способствует нуклеофильной атаке молекулы воды на скорость-лимитирующей стадии реакции [127], что отличает данную модель от большинства существующих моделей ферментативного гидролиза аминоксил-тРНК, в том числе и от предполагаемого механизма гидролиза цистеинил-тРНК^{Про} гомологичной редактирующему домену ПроРС деацилазой YbaK [3].

4.2.2. Обобщение полученных результатов. В настоящее время для ПроРС отсутствуют прямые структурные данные о расположении мисацилированной тРНК в активном центре её редактирующего домена. Поэтому для выяснения структурно-функциональной организации редактирующего активного центра в комплексе с аланил-тРНК^{Про} и механизма катализа мы использовали комплекс других подходов. Использование мутационного анализа и модификаций тРНК позволили выявить два

структурных элемента, в наибольшей мере ответственных за посттрансферное редактирование ПроРСЕf – 2'-гидроксильную группу аланил-тРНК^{Pro} и аминокислотный остаток K279 редактирующего домена. Сопоставление полученных данных с результатами компьютерного моделирования позволило подтвердить предложенный механизм [127] ферментативного катализа деацилирования аланил-тРНК^{Pro}.

В условиях субстрат-ассистированного катализа одной из основных функций фермента мы можем считать фиксацию специфической конформации аланил-тРНК^{Pro}, обеспечивающей взаимодействие карбонильной группы остатка аланина с 2'-гидроксильной группой A76, а также устойчивое позиционирование двух участвующих в реакции молекул воды в оптимальном для реакции положении, в непосредственной близости от гидролизуемой связи. Хотя роль структурных элементов активного центра фермента не всегда может быть показана с той же чёткостью, что и роль 2'-ОН тРНК^{Pro}, нам удалось получить результаты, непосредственно указывающие на роль некоторых аминокислотных остатков в процессе реакции редактирования.

Наиболее функционально важным из них оказался лизин K279. Его боковая цепь, как показывают структурные данные, обращена в сторону от остальных элементов активного центра, и, согласно компьютерной модели, участвует в связывании акцепторного конца аланил-тРНК^{Pro} [52]. Таким образом, K279 не входит в активный центр редактирующего домена как таковой. Однако, он взаимодействует с ССА-концом редактируемой аланил-тРНК^{Pro}, связывая и позиционируя его в активном центре посредством взаимодействия с остатком фосфорной кислоты A76. Это взаимодействие косвенно подтверждается кристаллографическими данными об апоферменте ПроРСЕf, где K279 связан с ионом SO_4^{2-} раствора [52], а также литературными данными о его роли в реакции редактирования ПроРСЕс [149]. Как в ПроРСЕf, так и в ферменте *E. coli* [107], замена лизина K279 на аланин оказывает наибольшее влияние на посттрансферную редактирующую активность среди всех изученных аминокислотных остатков. По-видимому, его роль незаменима

на этапе первичного связывания 3'-конца аланил-тРНК^{Про} в активном центре редактирующего домена, и по этой причине оказывается ключевой для осуществления ферментом посттрансферного редактирования. Кроме того, взаимодействие K279 с аланил-тРНК^{Про}, вероятно, влияет на конформацию соседствующего с ним в полипептидной цепи аминокислотного остатка I278, вовлечённого в позиционирование молекулы воды, участвующей в переносе протона, что должно быть существенным для эффективного катализа. Перечисленные обстоятельства объясняют падение посттрансферной редактирующей активности на три порядка при замене K279 на аланин, несмотря на то, что он не содержит химических групп, непосредственно участвующих в катализе.

Роль гистидина H366 заключается в первую очередь в обеспечении субстратной специфичности деацилирующего активного центра. Замена гомологичного гистидина H369 на аланин либо цистеин в ферменте *E. coli* приводила не только к падению посттрансферной редактирующей активности, но и к нарушению специфичности деацилирования, проявляющемся в гидролизе пролил-тРНК^{Про} [107]. Аналогичный результат получен нами при замене на аланин гомологичного H366 ПроPSEf. Узнавание этой мутантной формой фермента большего по размеру субстрата, по-видимому, связано с изменением размеров и конфигурации кармана, в котором располагается редактируемый аминокислотный остаток [107]. Неподвижность иминогруппы пролина в отличие от аминогруппы аланина может влиять и на конформацию связанного субстрата, а, следовательно, на эффективность катализа, объясняя снижение посттрансферной редактирующей активности [109]. Кроме того, согласно данным квантово-химического моделирования реакции деацилирования аланил-тРНК^{Про} ПроPSEf [127], боковой радикал H366 участвует в координации протонированной аминогруппы гидролизуемого остатка аланина на этапах тетраэдрального промежуточного соединения и по завершении реакции. Наряду с H366 эта группа координирована с карбонильной группой G331, и, через молекулу воды, с фосфатной группой

A76 тРНК^{Pro}. Стоит обратить внимание на тот факт, что в то время как протонированная аминогруппа остатка аланина способна участвовать одновременно в трёх водородных связях, каковая возможность реализуется в ходе реакции, иминогруппа остатка пролина способна служить донором не более чем двух водородных связей. Это обстоятельство также может иметь значение для специфичности деацилирования аланил-тРНК^{Pro}, делая невозможным связывание остатка пролина с H366 в начале реакции деацилирования.

Хотя протонированная аминогруппа гидролизуемого остатка аланина и фиксируется посредством координированной молекулы воды фосфатной группой A76 аланил-тРНК^{Pro}, в свою очередь, зафиксированной взаимодействием с аминокислотным остатком K279, существенную роль в её позиционировании перед началом реакции играет карбонильная группа остатка G331. Для шестикратного падения посттрансферной редактирующей активности фермента достаточно добавления в этой позиции метильной группы при замене на аланин, что, по-видимому, сопровождается изменением конформации основной цепи.

Следует особо отметить роль в катализе реакции деацилирования аланил-тРНК^{Pro} карбонильных групп I333 и I278. В предложенном механизме гидролиза [127] карбонильные группы основной цепи этих остатков координируют две молекулы воды, участвующие в гидролизе, делая возможным перенос протона. Мутации I333A и I278A привели к существенному падению редактирующей активности ПроPCEf (в 13 и 50 раз соответственно), что подтверждает их роль в предложенном механизме гидролиза. Следует отметить, что, хотя боковые цепи этих остатков изолейцина и не участвуют напрямую в исследуемых нами процессах, они оба, согласно структурным данным, входят в состав гидрофобных кластеров, закоривая в них основную цепь, и, очевидно, обеспечивая таким образом её конформационную стабильность. По этой причине исследование их функции методом сайт-направленного мутагенеза представляется нам полностью

оправданным. Участие карбонильных групп основной цепи фермента в катализе показано также для некоторых других ферментов, катализирующих гидролиз аминоксил-тРНК. К ним относится белок YbaK, который является структурным гомологом редактирующего домена прокариотических ПроРС, но в отличие от последних, гидролизует не аланил-тРНК^{Pro}, а цистеинил-тРНК^{Pro}. Замещение на аланин G110 и G131 вызывало снижение скорости реакции деацилирования, катализируемой YbaK в 28 и 36 раз [128]. В другом случае, касающемся негомологичного редактирующего домена ТреРС *P. abyssi*, кристаллическая структура фермента в комплексе с аналогом субстрата посттрансферного редактирования не позволяет идентифицировать боковые цепи аминокислотных остатков, способные принимать участие в катализе. Кристаллографически зафиксированная молекула воды в активном центре редактирующего домена ТреРС связана с атомами основной цепи R116 и T119, и находится вблизи 2'-ОН группы аналога субстрата. Карбонильная группа может играть роль в переносе протона при посттрансферном редактировании ТреРС *P.abyssi* [83]. Наконец, в случае ПроРСЕс предполагается, что карбонильная группа основной цепи K261, соответствующая G261 ProRSEf, играет роль в переносе протона от каталитической молекулы воды на 3'-О A76 [2]. К сожалению, для проверки критической роли карбонильной группы K261 в катализе авторы использовали делеционные мутантные формы ПроРСЕс. Делеция аминокислотного остатка с высокой вероятностью ведёт к локальным конформационным изменениям, несовместимым с эффективной работой активного центра, пусть даже делетированный остаток сам по себе и не несёт никакой специфической функции, что, по сути, обесценивает данный подход.

Согласно квантово-химической модели реакции деацилирования аланил-тРНК^{Pro} [127], в координировании молекулы воды, задействованной в переносе протона, и обозначаемой в данной работе как W2, наряду с I278, молекулой воды W1, и тетраэдральным промежуточным соединением, участвует аминокислотный остаток S280, посредством гидроксильной группы бокового радикала. Однако, его замена на аланин снижает посттрансферную

редактирующую активность лишь вдвое. Этот факт позволяют объяснить результаты моделирования молекулярной динамики, показывающие возможность образования водой W2 водородной связи с карбонильным кислородом Ile357 в случае потери связи с Ser280. На этом фоне 13-кратное падение активности мутантной формы I278A можно приписать изменению конформации участка полипептидной цепи I278-K279-S280, затрагивающему оба аминокислотных остатка, координирующие молекулу воды W2, и остаток, связывающий фосфат A76 аланил-тРНК^{Про}.

Таким образом, аминокислотные остатки активного центра редактирующего домена ПроPCEf фиксируют субстрат в конформации, способствующей его гидролизу, а также позиционируют молекулу воды, осуществляющую нуклеофильную атаку на углерод карбонильной группы субстрата, а также воду, обеспечивающую перенос протона с атакующей молекулы на 3'-О рибозы.

Разрыву двойной связи карбонильной группы гидролизуемого остатка аланина способствует взаимодействие кислорода этой группы с 2'-гидроксильной группой рибозы A76 [127]. В отсутствие этого взаимодействия гидролиз редактируемой аминокислот-тРНК в использованных нами модельных системах оказывался либо крайне затруднён, либо полностью невозможен. Таким образом, посттрансферное редактирование ПроPCEf основано на субстрат-ассистированном катализе.

В случае субстратов, содержащих 2'-d и 2'-F модификации A76, связь не образуется, что и следует рассматривать как причину их затруднённого гидролиза. С экспериментальными данными хорошо согласуются результаты расчёта энергий активации для субстрата дикого типа и несущих модификации A76 по 2'-положению (табл. 4.1) [127]. Разница с диким типом здесь составляет 7,16 ккал/моль для 2'-F, и 12,49 ккал/моль для 2'-d производного. Меньший эффект 2'-F модификации можно связать со смещением электронной плотности за счёт высокой электроотрицательности атома фтора.

Непосредственное участие тРНК в механизме посттрансферного редактирования известно для ПроРСЕс [2], ЛейРС [104, 129, 53], ФенРС [4], и становится в один ряд с активной ролью тРНК в активации аминокислоты [130], аминоацилировании [131], транспептидазной реакции [132] и фактор-зависимом гидролизе пептидил-тРНК при высвобождении полипептидной цепи [133]. В каталитических процессах всех перечисленных реакций непосредственное участие принимает соседствующая с аминоацильной группой гидроксильная группа рибозы А76 тРНК.

Взятые вместе, данные по претрансферному и посттрансферному редактированию демонстрируют активную роль тРНК^{Pro} на двух стадиях обеспечения точности трансляции пролиновых кодонов. Структура А76 тРНК, содержащая химически активную гидроксильную группу в непосредственной близости от места прикрепления переносимого аминокислотного остатка, в ходе эволюции оказалась дважды независимо привлечена к обеспечению точности синтеза пролил-тРНК^{Pro}. В том числе, на этапе посттрансферного редактирования функциональная группа тРНК посредством водородного связывания облегчает гидролиз редактируемого аминокислотного остатка, что можно рассматривать как пример РНК-белкового субстрат-ассистированного катализа, впервые постулированного для ЛейРС [104; 129; 53]. В предложенном механизме ферментативного гидролиза аланил-тРНК^{Pro}, 2'-гидроксильная группа А76 путём образования внутримолекулярной водородной связи оказывается ответственна за перераспределение электронной плотности в молекуле субстрата [127].

Обсуждение данной работы не могло бы принять завершённый вид без привлечения данных компьютерного моделирования [127], коренным образом расширяющих возможности для интерпретации экспериментальных данных. В частности, это дало нам возможность углублённого сопоставления полученных нами результатов с результатами, описанными в литературе для других белков, выполняющих функции посттрансферного редактирования. В первую очередь, необходимым является сравнение используемых нами данных [127] с данными,

полученными зарубежной группой учёных частью на гомологичном, а частью на том же самом объекте. В 2012 году Кумар и соавторы опубликовали работу, в которой экспериментальное исследование посттрансферной редактирующей активностей ПроРСЕс было дополнено данными молекулярной динамики и гибридных квантово-механических/молекулярно-механических (QM/MM) вычислений, основанных на кристаллической структуре ПроРСЕf [2].

Предложенный в работе Кумара и соавторов механизм ферментативного гидролиза аланил-тРНК^{Про} предполагает участие 2'-гидроксильной группы А76 субстрата в активации реагирующей молекулы воды, и перенос протона на 3'-О А76 через основную цепь Гли261. При этом, функциональная значимость этого аминокислотного остатка не нашла убедительного экспериментального подтверждения, так как соответствующая делеционная мутантная форма ПроРСЕс характеризуется ослабленной способностью к связыванию субстрата в его редактирующей конформации [2]. Несмотря на принципиальную общность методологических подходов, применённых в построении молекулярной и квантово-механической моделей, между двумя работами присутствуют существенные различия.

Основное отличие подхода наших соавторов [127] состоит в том, что их вычисления базируются на существующей модели полноразмерного комплекса ПроРС с аланил-тРНК^{Про} в конформации редактирования [52], а не модели отдельно взятой части этого комплекса [2]. По нашему мнению, это позволило учесть влияние особенностей связывания тРНК^{Про} ПроРС на позиционирование её 3'-конца при посттрансферном редактировании.

Представленная молекулярная модель [127] отличается от модели Кумара и соавторов, где ССА-конец аланил-тРНК^{Про} находится в релаксированной конформации, и А76 образует стекинг-взаимодействие с С75. Также в представленной модели [127] остаток аденина А76 повернут атомом азота N3 в сторону остатка аланина, в то время как в модели Кумара и соавторов он повернут к фосфатной группе А76.

Кумар и соавторы использовали для квантово-механических вычислений лишь очень небольшую часть полученной ими молекулярной модели: только 7-10 аминокислотных остатков и А76 тРНК^{Pro} [2]. В представленной работе [127] для аналогичных целей брался участок модели, включавший 28 аминокислотных остатков и аланил-ССА часть аланил-тРНК^{Pro}. Эти обстоятельства позволяют нам уверенно интерпретировать полученные результаты и сравнивать их с результатами, полученными для других редактирующих АРС и деацилаз.

Все предложенные на сегодняшний день механизмы ферментативного деацилирования аминоксил-тРНК можно разделить на обычные и субстрат-ассистированные. К первым следует отнести деацилирование серил-тРНК^{Trp} ТреРС *E. coli* [84] (рис. 1.5). В треониновой системе кислотно-основной катализ осуществляется аминокислотными остатками фермента Гис73 и Лиз156. При этом необходимо отметить, что реконструкция каталитического механизма ТреРС опирается исключительно на кристаллографические данные. Сюда же нужно отнести предложенный Творовским и соавторами механизм деацилирования 2'-региоизомера тирозил-тРНК^{Phe} ФенРС *T. thermophilus* после предполагаемого переацилирования [90] (рис. 1.6). Координирующая молекулу воды боковая цепь Тре249 здесь выступает акцептором водородной связи, и может активировать её для нуклеофильной атаки по карбонильному углероду субстрата. Ниже будут приведены соображения в пользу того, что этот путь посттрансферного редактирования у ФенРС является минорным.

Большинство предложенных механизмов посттрансферного редактирования выступают субстрат-ассистированными. Среди них особняком стоит катализируемая деацилазой YbaK *E. coli* внутримолекулярная реакция в цистеинил-тРНК^{Pro}, приводящая к деацилированию тРНК^{Pro} и образованию тиолактона цистеина. Она катализируется путём активации тиольной группы субстрата водородной связью с карбонильной группой основной цепи Фен29 [3] (рис. 1.8). Переходное состояние стабилизируется взаимодействием оксианиона с ГХХХФ-петлёй фермента, перенос протона на 3'-О

осуществляется напрямую через Фен29. По мнению авторов работы, однонаправленность реакции обеспечивается водородным взаимодействием между 2'-ОН в роли донора, и вновь сформированной 3'-ОН в роли акцептора водородной связи. Таким образом, активную роль в катализе играют и фермент, и субстрат.

Наиболее распространённой схемой субстрат-ассистируемого ферментативного гидролиза аминоксил-тРНК в литературе стала активация реагирующей молекулы воды свободной гидроксильной группой рибозы А76 тРНК через водородную связь. У ЛейРС *T. thermophilus* эту роль выполняет 3'-гидроксильная группа, связанная с Тре248. Другой остаток треонина, Тре247, участвует в стабилизации промежуточного продукта [53].

Аналогичная роль отводится субстрату ПроРСЕf в работе Кумара и соавторов [2], результаты которой автор вынужден оспаривать в настоящей работе. Здесь молекулу воды должна активировать 2'-гидроксильная группа (рис. 1.9), а стабилизация промежуточного состояния и перенос протона должны осуществляться посредством функциональных групп фермента. При этом делеционная мутантная форма белка по Гли261 (нумерация *E. coli*), который, по мнению авторов статьи [2], участвует в переносе протона, не способна, как следует из данных, приведённых в самой статье, обеспечивать конкурентную защиту субстрата от гидролиза, а значит, и эффективно связывать субстрат. Это обстоятельство не позволяет делать вывод о функциональной важности этого аминокислотного остатка. К сожалению, в настоящей работе нам не удалось получить экспрессию мутантной формы по гомологичной позиции ПроРСЕf Лиз261Ала, и экспериментально проверить её функциональную роль.

Третьим примером может выступать молекулярная модель, построенная на основе кристаллической структуры комплекса D-тирозил деацилазы *Plasmodium falciparum* с негидролизуемым аналогом D-Тир-3'-А, где 2'-гидроксильная группа также координирует молекулу воды, сближенную со связью, подлежащей гидролизу [93]. Впрочем, необходимо отметить, что эта

молекула отсутствует в кристаллической структуре комплекса белка с аналогом субстрата, и представление о ней является результатом молекулярного моделирования.

В отличие от приведённых примеров, рассмотренная нами модель гидролиза аланил-тРНК^{Pro} ПроРСЕf [127] предполагает координирование и активацию реагирующей молекулы воды аминокислотными остатками фермента. При этом внутримолекулярное взаимодействие в субстрате повышает частичный положительный заряд на атакуемом атоме углерода карбонильной группы гидролизуемого остатка аланина, и впоследствии участвует в стабилизации переходного состояния.

Единственный на сегодняшний день подобный пример нам даёт предложенный Творовским и соавторами механизм гидролиза ФенРС *T. thermophilus* 3'-региоизомера тирозил-тРНК^{Фен} (рис. 1.8) [90]. По нашему мнению, именно этот путь посттрансферного редактирования у ФенРС является физиологически значимым. Сопоставляя экспериментальные данные, полученные для ФенРС *E. coli*, показывающие снижение посттрансферной редактирующей активности на два порядка в случае 3'-d-модификации тирозил-тРНК^{Фен} [4], с механизмом деацилирования 2'-региоизомера, предложенным Творовским и соавторами [90], можно прийти к выводу о доминирующем переацилировании субстрата в 3'-региоизомер перед его гидролизом, так как иной существенной роли 3'-О в предложенных моделях не отведено [90]. Кроме того, само наличие редко встречаемого механизма переацилирования в редактирующем активном центре ФенРС может свидетельствовать о его сохранении стабилизирующим отбором, и, следовательно, о его доминирующей роли и физиологической значимости. В таком случае, перед нами оказывается третий известный случай ферментативного переацилирования аминоксил-тРНК, наряду с катализируемыми Ef-Tu [91] и редактирующим доменом ИлеРС [56]. Интересно отметить, что во всех трёх случаях перенос аминокислотного остатка оказывается направлен с 2'-О на 3'-О, и совпадает с преобладающим направлением соответствующего спонтанного процесса [134].

Сходство между механизмами гидролиза ошибочно синтезированных аминоксил-тРНК ПроРС и ФенРС заключается главным образом в образовании внутримолекулярной водородной связи между 2'-гидроксильной группой А76 субстрата, и карбонильной группой его аминокислотного остатка, подлежащего гидролизу. Если в случае ПроРС наличие этой связи снижает энергию активации не менее чем на 7 ккал/моль, то в редактирующем активном центре ФенРС подобная конформация субстрата может оказываться ещё более энергетически выгодной. Помимо существования аналогичной связи здесь предполагаются взаимодействия Гис261 с 3'-О и координируемой воды с 2'-О (рис. 1.6, б), которые также должны приводить к росту частичного положительного заряда на карбонильном атоме углерода остатка аланина. Таким образом, можно спекулятивно предположить, что в приобретении удобной для гидролиза конформации субстрата и заключается физиологический смысл ферментативного переацилирования тирозил-тРНК^{Фен} [90]. Также необходимо отметить, что, по крайней мере в случае ФенРС, использование свободной гидроксильной группы А76 для перераспределения парциальных зарядов в субстрате оказывается до 300 раз более эффективным, чем её использование для активации атакующей молекулы воды, как это следует из проведённого выше сопоставления экспериментальных [4] и расчётных [90] результатов двух групп исследователей. Впрочем, остаётся открытым вопрос о том, какая из схем субстрат-ассистируемого гидролиза аминоксил-тРНК доминирует в неферментативном процессе, также чувствительном к наличию свободной гидроксильной группы А76, как было показано в настоящей работе.

Сопоставление молекулярной и квантово-механической моделей, полученных для гомологичной редактирующему домену ПроРС деацилазы YbaK *E. coli* [3] с результатами настоящей работы и рассмотренной компьютерной моделью, позволяет оценить степень консервативности механизмов связывания субстрата и катализа химических реакций. Фосфат А76 цистеинил-тРНК^{Про} связывается Лиз46 деацилазы YbaK, абсолютно

консервативным у этого класса деацилаз, и гомологичным Лиз279 ПроРС*Ef*. Аминогруппа остатка цистеина фиксируется боковой цепью Асп136 YbaK, что соответствует взаимодействию гомологичного Гис366 с аминогруппой остатка аланина в случае ПроРС. У YbaK в связывании аминогруппы редактируемой аминокислоты задействована карбонильная группа Гли101 консервативной петли ГлиXXXФен, как и карбонильная группа гомологичного Гли331 ПроРС. Таким образом, YbaK использует средства связывания и позиционирования субстрата, гомологичные используемым ПроРС, хотя располагает для этого и дополнительными взаимодействиями.

Реакции, катализируемые редактирующим доменом ПроРС и деацилазой YbaK, носят различный характер. В первом случае для отщепления аминокислотного остатка от остатка тРНК^{Про} необходима нуклеофильная атака молекулы воды, а во втором – атака сульфгидрильной группы самого субстрата. При этом, положение сульфгидрильной группы перед реакцией, катализируемой YbaK, не совпадает с положением реагирующей воды в редактирующем домене ПроРС. Сульфгидрильная группа координируется и активируется аминокислотным остатком Фен29, гомологичным Иле263 ПроРС, не принимающему участия в катализе. В свою очередь, активацию реагирующей воды в ПроРС осуществляет остаток Иле333, в то время как его гомолог в YbaK Иле103 каталитической функции не выполняет. Таким образом, механизм запуска реакции у ПроРС и YbaK не является консервативным, что соответствует различному характеру запускаемых реакций.

Во время реакции, катализируемой YbaK, отрицательно заряженный атом кислорода тетраэдрального промежуточного соединения окружён консервативной петлёй ГлиXXXФен, образующей таким образом оксианионную дыру (oxyanionic hole). В случае ПроРС, атом кислорода карбонильной группы в переходном состоянии не претерпевает полной ионизации, и остаётся акцептором водородной связи с 2'-ОН А76 остатка тРНК^{Про}. При этом гидроксильная группа, являющаяся остатком реагирующей

воды, остаётся связанной с основной цепью Иле333. Таким образом, механизм стабилизации переходного состояния в двух рассматриваемых реакциях оказывается абсолютно различным. Нет сходства и в путях переноса протона на 3'-О А76 – у YbaK он осуществляется посредством Фен29, у ПроРС – посредством координированной Иле278 молекулы воды. Гомологичный Иле278 Тир45 YbaK в каталитических процессах не участвует.

Таким образом, специализация редактирующего домена ПроРС и деацилазы YbaK на схожих субстратах с различными химическими свойствами повлекла за собой различное распределение ключевых ролей между их функциональными группами, а также функциональными группами субстратов. При этом значительно более консервативными оказались взаимодействия, обеспечивающие связывание и позиционирование субстратов, хотя и здесь существуют различия. Наиболее существенным из них можно назвать связывание 2'-ОН А76 в случае YbaK со вторичной аминогруппой Гли101 консервативной петли ГлиXXXФен, вместо карбоксильной группы отщепляемого аминокислотного остатка. Это отличие можно связать со способностью сульфгидрильной группы остатка цистеина образовывать дополнительную по сравнению с остатком аланина водородную связь в активном центре фермента. Взаимодействие с основной цепью Фен29 определяет особенности конформации цистеинил-тРНК^{Про}, а значит, задаёт условия для оптимизации структуры активного центра под действием отбора.

Не участвуя в обеспечении нуклеофильной атаки, 2'-ОН А76 цистеинил-тРНК^{Про}, тем не менее, приобрела ключевую функцию, обеспечивая однонаправленность реакции на последнем её этапе. По мнению авторов работы, это достигается образованием водородной связи со вновь сформированной 3'-ОН. Роль 2'-ОН в катализе в качестве донора водородной связи подтверждена способностью 2'-dA76 цистеинил-тРНК^{Про} к конкурентному ингибированию деацилирования субстрата дикого типа, а также многократным снижением скорости ферментативного деацилирования в случае 2'-FA76-модификации субстрата. Таким образом, свободная гидроксильная

группа A76 аминоацил-тРНК и здесь нашла своё применение. Этот случай представляет третий из рассмотренных нами вариантов её использования в катализе деацилирования аминоацил-тРНК.

ВЫВОДЫ

Охарактеризованы механизмы претрансферного и посттрансферного редактирования ПроРС*Ef* продуктов ошибочного узнавания аланина. Участие 2'-ОН А76 тРНК^{Про} обеспечивает эффективность катализа на обеих стадиях редактирования.

1) Клонирован ген тРНК^{Про} *E. faecalis*, разработана методика экспрессии и очистки транскрипта тРНК^{Про}.

2) Создана гибридная тРНК^{ПроАла} для анализа посттрансферной редактирующей активности ПроРС, способная быть аминоацелированной АлаРС и деацелированной ПроРС в ходе посттрансферного редактирования.

3) Впервые показано тРНК-зависимое претрансферное редактирование у АРС второго структурного класса. Показана ведущая роль в этом процессе гидроксильных групп А76 тРНК^{Про}. Установлена специфическая роль 2'-гидроксильной группы А76 тРНК^{Про} в претрансферном редактировании, не сводимая к участию в связывании и позиционировании А76 тРНК^{Про} в аминоацелирующем активном центре.

4) Показана каталитическая природа тРНК-зависимого и тРНК-независимого претрансферного редактирования ПроРС*Ef*, а также частичное избирательное высвобождение аланил-АМФ в отсутствие тРНК^{Про}.

5) Экспериментально показана критическая роль аминокислотного остатка Лиз279 в посттрансферном редактировании ПроРС*Ef*, которая по результатам компьютерного моделирования объясняется связыванием ССА-конца аланил-тРНК^{Про}. Среди боковых цепей аминокислотных остатков редактирующего активного центра ПроРС*Ef* нет претендентов на прямую каталитическую функцию.

6) На двух разнородных экспериментальных моделях показана необходимость 2'-гидроксильной группы А76 тРНК^{Про} для посттрансферного редактирования ПроРС*Ef*.

7) Экспериментальные данные согласуются с предложенной квантово-химической моделью посттрансферного редактирования ПроРСЕf, предполагающей субстрат-ассистированный механизм катализа. Таким образом, в основе формирования предреакционного комплекса лежит образование карбоксильной группой редактируемого остатка аланина водородной связи с 2'-гидроксильной группой A76, что способствует снижению энергетического порога реакции гидролиза ангидридной связи. Перенос протона в ходе реакции происходит через молекулу воды, путём её превращения в мгновенно распадающийся ион гидроксония.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Beebe K. Elucidation of tRNA-dependent editing by a class II tRNA synthetase and significance for cell viability / Beebe K., Ribas De Pouplana L., Schimmel P. // *MBO J.* – 2003. Vol. 22, №3. – P. 668-75.
2. Kumar S. Substrate and enzyme functional groups contribute to translational quality control by bacterial prolyl-tRNA synthetase / Kumar S., Das M., Hadad C.M., Musier-Forsyth K. // *J. Phys. Chem. B.* – 2012. – Vol. 116, №23. – P. 6991-6999.
3. Kumar S. Aminoacyl-tRNA substrate and enzyme backbone atoms contribute to translational quality control by YbaK / Kumar S., Das M., Hadad C.M., Musier-Forsyth K. // *J. Phys. Chem. B.* – 2013. – Vol. 117, №16. – P. 4521-4527.
4. Ling J. Mechanism of tRNA-dependent editing in translational quality control / Ling J., Roy H., Ibba M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2007. – Vol. 104, №1. – P. 72-77.
5. Kang J. Biological applications of hybrid quantum mechanics/molecular mechanics calculation / Kang J., Hagiwara Y., Tateno M. // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 2012:236157.
6. Cvetesic N. The physiological target for LeuRS translational quality control is norvaline / Cvetesic N., Palencia A., Halasz I. [et al.] // *EMBO J.* – 2014. – Vol. 33, №15. – P. 1639-1653.
7. Lee N. Ribozyme-catalyzed tRNA aminoacylation / Lee N., Bessho Y., Wei K. [et al.] // *Nat. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 7, №1. – P. 28-33.
8. Rodin S. Two types of aminoacyl-tRNA synthetases could be originally encoded by complementary strands of the same nucleic acid / Rodin S., Ohno S. // *Origins of Life and Evolution of the Biosphere.*— 1995.—Vol. 25.—P. 565-589.
9. Yaremchuk A. Class I tyrosyl-tRNA synthetase has a class II mode of cognate tRNA recognition / Yaremchuk A., Kriklivyi I., Tukalo M., Cusack S. // *EMBO J.* – 2002. – Vol. 21, № 14. – P. 3829-3840.

10. Shen N. Structure of human tryptophanyl-tRNA synthetase in complex with tRNA^{Trp} reveals the molecular basis of tRNA recognition and specificity / Shen N., Guo L., Yang B. [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – Vol. 34, № 11. – P. 3246-3258.
11. Eriani G. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs / Eriani G., Delarue M., Poch O. [et al.] // *Nature.* – 1990. – Vol. 347, № 6289. – P. 203-206.
12. Perona J.J. Synthetic and editing mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetases / Perona J.J., Gruic-Sovulj I. // *Top. Curr. Chem.* – 2014. – Vol. 344. – P. 1-41.
13. Ibba M. Aminoacyl-tRNA synthesis in Archaea / Ibba M., Celic I., Curnow A. [et al.] // *Nucleic Acids Symp. Ser.* – 1997, № 37. – P. 305-306.
14. Blight S. Direct charging of tRNA(CUA) with pyrrolysine in vitro and in vivo / Blight S.K., Larue R.C., Mahapatra A. [et al.] // *Nature.* – 2004. – Vol. 431, № 7006. – P. 333-335.
15. Sauerwald A. RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea / Sauerwald A, Zhu W, Major TA [et al.] // *Science.* – 2005. – Vol. 307, № 5717. – P. 1969-1972.
16. Kavran J. Structure of pyrrolysyl-tRNA synthetase, an archaeal enzyme for genetic code innovation / Kavran J.M., Gundllapalli S., O'Donoghue P. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2007. – Vol. 104, № 27. – P. 11268-11273.
17. O'Donoghue P. The evolutionary history of Cys-tRNA^{Cys} formation / O'Donoghue P., Sethi A., Woese C.R., Luthey-Schulten Z.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2005. – Vol. 102, № 52. – P. 19003-19008.
18. Cusack S. Eleven down and nine to go / Cusack S. // *Nat. Struct. Biol.* – 1995. – Vol. 2, №10. – P. 824-831.
19. Arnez J.G. Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction / Arnez J.G., Moras D. // *Trends Biochem. Sci.* – 1997. – Vol. 22, №6. – P. 211-216.

20. Eriani G. Role of dimerization in yeast aspartyl-tRNA synthetase and importance of the class II invariant proline / Eriani G., Cavarelli J., Martin F. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – Vol. 90, №22. – P. 10816-10820.
21. Rossmann M. Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein / Rossmann M.G., Moras D., Olsen K.W. // Nature. – 1974. – Vol. 250, №463. – P. 194-199.
22. Cusack S. A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å resolution / Cusack S., Berthet-Colominas C., Hartlein M. [et al.] // Nature. – 1990. – Vol. 347. – P. 249–255.
23. Artymiuk P. A tale of two synthetases / Artymiuk P.J., Rice D.W., Poirrette A.R., Willet P. // Nat. Struct. Biol. – 1994. – Vol. 1, №11. – P. 758-760.
24. Shitivelband S. Breaking the stereo barrier of amino acid attachment to tRNA by a single nucleotide / Shitivelband S., Hou Y.M. // J. Mol. Biol. – 2005. – Vol. 348, №3. – P. 513-521.
25. Sprinzl M. Site of aminoacylation of tRNAs from *Escherichia coli* with respect to the 2'- or 3'-hydroxyl group of the terminal adenosine / Sprinzl M., Cramer F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1975. – Vol. 72, №8. – P. 3049-3053.
26. Zhang C. Distinct kinetic mechanisms of the two classes of Aminoacyl-tRNA synthetases / Zhang C.M., Perona J.J., Ryu K. [et al.] // J. Mol. Biol. – 2006. – Vol. 361, №2. – P. 300-311.
27. Cassio D. Modification of methionyl-tRNA synthetase by proteolytic cleavage and properties of the trypsin-modified enzyme / Cassio D., Waller J.P. // Eur. J. Biochem. – 1971. – Vol. 20, №2. – P. 283-300.
28. Jasin M. Modular arrangement of functional domains along the sequence of an aminoacyl tRNA synthetase / Jasin M., Regan L., Schimmel P. // Nature. – 1983. – Vol. 306, №5942. – P. 441-447.
29. Delarue M. The aminoacyl-tRNA synthetase family: modules at work / Delarue M., Moras D. // Bioessays. – 1993. – Vol. 15, №10. – P. 675-687.

30. Wolf Y. Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases – analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events / Wolf Y., Aravind L., Grishin N.V., Koonin E.V. // *Genome Res.* – 1999. – Vol. 9, №8. – P. 689-710.
31. Schimmel P. Transfer RNA: from minihelix to genetic code / Schimmel P., Ribas de Pouplana L. // *Cell.* – 1995. – Vol. 81, №7. – P. 983-986.
32. Ogle J.M. Structural insights into translational fidelity / Ogle J.M., Ramakrishnan V. // *Annu. Rev. Biochem.* – 2005. – Vol. 74. – P. 129-177.
33. Dock-Bregeon A. Transfer RNA-mediated editing in threonyl-tRNA synthetase. The class II solution to the double discrimination problem / Dock-Bregeon A., Sankaranarayanan R., Romby P. [et al.] // *Cell.* – 2000. – Vol. 103, №6. – P. 877-884.
34. Beebe K. A domain for editing by an archaeobacterial tRNA synthetase / Beebe K., Merriman E., Ribas De Pouplana L., Schimmel P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101, №16. – P. 5958-5963.
35. Ahel I. Trans editing of mischarged tRNAs / Ahel I., Korencic D., Ibba M., Söll D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100, №26. – P. 15422-15427.
36. An S. Trans-editing of Cys-tRNA^{Pro} by *Haemophilus influenzae* YbaK protein / An S., Musier-Forsyth K. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, №41. – P. 42359-42362.
37. Murayama K. Structure of a putative trans-editing enzyme for prolyl-tRNA synthetase from *Aeropyrum pernix* K1 at 1.7 Å resolution / Murayama K., Kato-Murayama M., Katsura K. [et al.] // *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* – 2005. – Vol. 61. – P. 26-29.
38. Pauling, L. (1957) in *Festschrift Arthur Stoll, The probability of errors in the process of synthesis of protein molecules*, ed Birkhauser A. (Birkhauser, Basel, Switzerland), P. 597–602.
39. Fersht A.R. Probing the limits of protein-amino acid side chain recognition with the aminoacyl-tRNA synthetases. Discrimination against phenylalanine by

- tyrosyl-tRNA synthetases / Fersht A.R., Shindler J.S., Tsui W.C. // *Biochemistry*. – 1980. – Vol. 19, №24. – P. 5520-5524.
40. Lofthfield R.B. The frequency of errors in protein biosynthesis / Lofthfield R.B., Vanderjagt D. // *Biochem. J.* – 1972. – Vol. 128, №5. – P. 1353-1356.
41. Hopfield J. Direct experimental evidence for kinetic proofreading in aminoacylation of tRNA^{Ile} / Hopfield J.J., Yamane T., Yue V., Coutts S.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1976. – Vol. 73, №4. – P. 1164-1168.
42. Baldwin A.N. Transfer ribonucleic acid-induced hydrolysis of valyladenylate bound to isoleucyl ribonucleic acid synthetase / Baldwin A.N., Berg P. // *J. Biol. Chem.* – 1966. – Vol. 241, №4. – P. 839-845.
43. Hopfield J.J. Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity / Hopfield J.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1974. – Vol. 71, №10. – P. 4135-4139.
44. Ninio J. Kinetic amplification of enzyme discrimination / Ninio J. // *Biochimie.* – 1975. – Vol. 57, №5. – P. 587-595.
45. Hati S. Pre-transfer editing by class II prolyl-tRNA synthetase: role of aminoacylation active site in "selective release" of noncognate amino acids / Hati S., Ziervogel B., Sternjohn J. [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281, №38. – P. 27862-27872.
46. Splan K.E. Transfer RNA modulates the editing mechanism used by class II prolyl-tRNA synthetase / Splan K.E., Ignatov M.E., Musier-Forsyth K. // *J. Biol. Chem.* 2008. – Vol. 283, №11. – P. 7128-7134.
47. Fersht A.R. Editing mechanisms in protein synthesis. Rejection of valine by the isoleucyl-tRNA synthetase / Fersht A.R. // *Biochemistry.* – 1977. – Vol. 16, №5. – P. 1025-1030.
48. Fersht A.R. Evidence for the double-sieve editing mechanism in protein synthesis. Steric exclusion of isoleucine by valyl-tRNA synthetases / Fersht A.R., Dingwall C. // *Biochemistry.* – 1979. – Vol. 18, №12. – P. 2627-2631.

49. Jakubowski H. Alternative pathways for editing non-cognate amino acids by aminoacyl-tRNA synthetases / Jakubowski H., Fersht A.R. // *Nucleic Acids Res.* – 1981. – Vol. 9, №13. – P. 3105-3117.
50. Dulic M. Partitioning of tRNA-dependent editing between pre- and post-transfer pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases / Dulic M., Cvetesic N., Perona J.J., Gruic-Sovulj I. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, №31. – P. 23799-23809.
51. Splan K. In vitro assays for the determination of aminoacyl-tRNA synthetase editing activity / Splan K.E., Musier-Forsyth K., Boniecki M.T., Martinis S.A. // *Methods.* – 2008. – Vol. 44, №2. – P. 119-128.
52. Crepin T. Structures of two bacterial prolyl-tRNA synthetases with and without a cis-editing domain / Crepin T., Yaremchuk A., Tukalo M., Cusack S. // *Structure.* – 2006. – Vol. 14, №10. – P. 1511-1525.
53. Hagiwara Y. Editing mechanism of aminoacyl-tRNA synthetases operates by a hybrid ribozyme/protein catalyst / Hagiwara Y., Field M.J., Nureki O., Tateno M. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – Vol. 132, №8. – P. 2751-2758.
54. Bishop A.C. Blocking site-to-site translocation of a misactivated amino acid by mutation of a class I tRNA synthetase / Bishop A.C., Nomanbhoy T.K., Schimmel P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, №2. – P. 585-590.
55. Hendrickson T. Mutational separation of two pathways for editing by a class I tRNA synthetase / Hendrickson T.L., Nomanbhoy T.K., de Crécy-Lagard V. [et al.] // *Mol. Cell.* – 2002. – Vol. 9, №2. – P. 353-362.
56. Nordin B.E. Transiently misacylated tRNA is a primer for editing of misactivated adenylates by class I aminoacyl-tRNA synthetases / Nordin B.E., Schimmel P. // *Biochemistry.* – 2003. – Vol. 42, №44. – P. 12989-12997.
57. Lin L. Aminoacylation error correction / Lin L, Hale SP, Schimmel P. // *Nature.*— 1996.— Vol. 384, №6604. – P. 33-43.
58. Nureki O. Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate / Nureki O., Vassylyev D.G., Tateno M. [et al.] // *Science.* – 1998. – Vol. 280, №5363. – P. 578-582.

59. Lin L. Mutational analysis suggests the same design for editing activities of two tRNA synthetases / Lin L., Schimmel P. // *Biochemistry*. – 1996. – Vol. 35, №17. – P. 5596-5601.
60. Fukai S. Structural basis for double-sieve discrimination of L-valine from L-isoleucine and L-threonine by the complex of tRNA(Val) and valyl-tRNA synthetase / Fukai S., Nureki O., Sekine S. [et al.] // *Cell*. – 2000. – Vol. 103, №5. – P. 793-803.
61. Zhu B. tRNA-independent pretransfer editing by class I leucyl-tRNA synthetase / Zhu B., Yao P., Tan M. [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, №6. – P. 3418-3424.
62. Jakubowski H. Translational accuracy of aminoacyl-tRNA synthetases: implications for atherosclerosis / Jakubowski H. // *J. Nutr.* – 2001. – Vol. 131, №11. – P. 2983-2987.
63. Tukalo M. The crystal structure of leucyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Leu} in the post-transfer-editing conformation / Tukalo M., Yaremchuk A., Fukunaga R. [et al.] // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 12, №10. – P. 923-930.
64. Lincecum T.L. Structural and mechanistic basis of pre- and posttransfer editing by leucyl-tRNA synthetase / Lincecum T.L., Tukalo M., Yaremchuk A. [et al.] // *Mol. Cell*. – 2003. – Vol. 11, №4. – P. 951-963.
65. Boero M. LeuRS synthetase: a first-principles investigation of the water-mediated editing reaction / Boero M. // *J. Phys. Chem. B*. – 2011. – Vol. 115, №42. – P. 12276-12286.
66. Englisch S. The proofreading of hydroxy analogues of leucine and isoleucine by leucyl-tRNA synthetases from *E. coli* and yeast / Englisch S., Englisch U., von der Haar F., Cramer F. // *Nucleic Acids Res.* – 1986. – Vol. 14. – P. 7529-7539.
67. Boniecki M. CP1-dependent partitioning of pretransfer and posttransfer editing in leucyl-tRNA synthetase / Boniecki M.T., Vu M.T., Betha A.K., Martinis S.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2008. – Vol. 105, №49. – P. 19223-19228.

68. Jakubowski H. Proofreading *in vivo*. Editing of homocysteine by aminoacyl-tRNA synthetases in *Escherichia coli* / Jakubowski H. // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270, №30. – P. 17672-17673.
69. Fortowsky G. Substrate-Assisted and Enzymatic Pretransfer Editing of Nonstandard Amino Acids by Methionyl-tRNA Synthetase / Fortowsky G.B., Simard D.J., Aboelnga M.M., Gauld J.W. // Biochemistry. – 2015. – Vol. 54, №37. – P. 5757-5765.
70. Fourmy D. Crucial role of an idiosyncratic insertion in the Rossman fold of class I aminoacyl-tRNA synthetases: the case of methionyl-tRNA synthetase / Fourmy D., Mechulam Y., Blanquet S. // Biochemistry. – 1995. – Vol. 34, №48. – P. 15681-15688.
71. Gruic-Sovulj I. Hydrolysis of non-cognate aminoacyl-adenylates by a class II aminoacyl-tRNA synthetase lacking an editing domain / Gruic-Sovulj I., Rokov-Plavec J., Weygand-Durasevic I. // FEBS Lett. – 2007. – Vol. 581, №26. – P. 5110-5114.
72. Guo M. Paradox of mistranslation of serine for alanine caused by AlaRS recognition dilemma / Guo M., Chong Y.E., Shapiro R. [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 462, №7274. – P. 808-812.
73. Sokabe M. The structure of alanyl-tRNA synthetase with editing domain / Sokabe M., Ose T., Nakamura A. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106, №27. – P. 11028-11033.
74. Ling J. Resampling and editing of mischarged tRNA prior to translation elongation / Ling J., So B.R., Yadavalli S.S. [et al.] // Mol. Cell. – 2009. – Vol. 33, №5. – P. 654-660.
75. Pasman Z. Substrate specificity and catalysis by the editing active site of Alanyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* / Pasman Z., Robey-Bond S., Miranda A.C. [et al.] // Biochemistry. – 2011. – Vol. 50, №9. – P. 1474-1482.

76. Lee J. Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration / Lee J.W., Beebe K., Nangle L.A. [et al.] // *Nature*. – 2006. – Vol. 443, №7107. – P. 50-55.
77. Beebe K. Distinct domains of tRNA synthetase recognize the same base pair / Beebe K., Mock M., Merriman E., Schimmel P. // *Nature*. – 2008. – Vol. 451, №7174. – P. 90-93.
78. Naganuma M. Unique protein architecture of alanyl-tRNA synthetase for aminoacylation, editing, and dimerization / Naganuma M., Sekine S., Fukunaga R., Yokoyama S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106, №21. – P. 8489-8494.
79. Sokabe M. Molecular basis of alanine discrimination in editing site / Sokabe M., Okada A., Yao M. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2005. – Vol. 102, №33. – P. 11669-11674.
80. Sankaranarayanan R. The structure of threonyl-tRNA synthetase-tRNA(Thr) complex enlightens its repressor activity and reveals an essential zinc ion in the active site / Sankaranarayanan R., Dock-Bregeon A.C., Romby P. [et al.] // *Cell*. – 1999. – Vol. 97, №3. – P. 371-381.
81. Sankaranarayanan R. Zinc ion mediated amino acid discrimination by threonyl-tRNA synthetase / Sankaranarayanan R., Dock-Bregeon A.C., Rees B. [et al.] // *Nat. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 7, №6. – P. 461-465.
82. Minajigi A. Aminoacyl transfer rate dictates choice of editing pathway in threonyl-tRNA synthetase / Minajigi A., Francklyn C.S. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, №31. – P. 23810-23817.
83. Hussain T. Post-transfer editing mechanism of a D-aminoacyl-tRNA deacylase-like domain in threonyl-tRNA synthetase from archaea / Hussain T., Kruparani S.P., Pal B. [et al.] // *EMBO J.* – 2006. – Vol. 25, №17. – P. 4152-4162.
84. Dock-Bregeon A. Achieving error-free translation; the mechanism of proofreading of threonyl-tRNA synthetase at atomic resolution / Dock-Bregeon A.C., Rees B., Torres-Larios A. [et al.] // *Mol. Cell*. – 2004. – Vol. 16, №3. – P. 375-386.

85. Ling J. The mechanism of pre-transfer editing in yeast mitochondrial threonyl-tRNA synthetase / Ling J., Peterson K.M., Simonovic I. [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, №34. – P. 28518-28525.
86. Roy H. Post-transfer editing in vitro and in vivo by the beta subunit of phenylalanyl-tRNA synthetase / Roy H., Ling J., Irnov M., Ibba M. // *EMBO J.* – 2004. – Vol. 23, №23. – P. 4639-4648.
87. Sasaki H. Structural and mutational studies of the amino acid-editing domain from archaeal/eukaryal phenylalanyl-tRNA synthetase / Sasaki H.M., Sekine S., Sengoku T. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103, №40. – P. 14744-14749.
88. Kotik-Kogan O. Structural basis for discrimination of L-phenylalanine from L-tyrosine by phenylalanyl-tRNA synthetase / Kotik-Kogan O., Moor N., Tworowski D., Safro M. // *Structure.* – 2005. – Vol. 13, №12. – P. 1799-1807.
89. Roy H. Loss of editing activity during the evolution of mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase / Roy H., Ling J., Alfonzo J., Ibba M. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, №46. – P. 38186-38192.
90. Tworowski D. Universal pathway for posttransfer editing reactions: insights from the crystal structure of TtPheRS with puromycin / Tworowski D., Klipcan L., Peretz M., Moor N., Safro M.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2015. – Vol. 112, №13. – P. 3967-72.
91. Forster C. Effector region of the translation elongation factor EF-Tu GTP complex stabilizes an orthoester acid intermediate structure of aminoacyl-tRNA in a ternary complex / Forster C., Limmer S., Zeidler W., Sprinzl M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1994. – Vol. 91, №10. – P. 4254-4257.
92. Bhatt T. Ligand-bound structures provide atomic snapshots for the catalytic mechanism of D-amino acid deacylase / Bhatt T.K., Yogavel M., Wydau S., [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, №8. – P. 5917–5930.
93. Ahmad S. Mechanism of chiral proofreading during translation of the genetic code / Ahmad S., Routh S.B., Kamarthapu V., Chalissery C., Muthukumar S., Hussain

- T., Kruparani S., Deshmukh M., Sankaranarayanan R. // eLife. – 2013. – Vol. 2. – P. 1-18.
94. Tan M. tRNA-dependent pre-transfer editing by prokaryotic leucyl-tRNA synthetase / Tan M., Zhu B., Zhou X.L. [et al.] // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285, №5. – P. 3235-3244.
95. An S. Cys-tRNA^{Pro} editing by Haemophilus influenzae YbaK via a novel synthetase-YbaK-tRNA ternary complex / An S., Musier-Forsyth K. // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280, №41. – P. 34465 - 34472.
96. Weinger J.S. Participation of the tRNA A76 hydroxyl groups throughout translation / Weinger J.S., Strobel S.A. // Biochemistry. – 2006. – Vol. 45, №19. – P. 5939-5948.
97. Jin H. Structure of the 70S ribosome bound to release factor 2 and a substrate analog provides insights into catalysis of peptide release / Jin H., Kelley A.C., Loakes D., Ramakrishnan V. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – Vol. 107, №19. – P. 8593-8598.
98. Wong F. An isolated class II aminoacyl-tRNA synthetase insertion domain is functional in amino acid editing / Wong F.C., Beuning P.J., Silvers C., Musier-Forsyth K. // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278, №52. – P. 52857-52864.
99. Ruan B. The bacterial YbaK protein is a Cys-tRNA^{Pro} and Cys-tRNA^{Cys} deacylase / Ruan B., Söll D. // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280, №27. – P. 25887-25891.
100. Ahel I. Cysteine activation is an inherent in vitro property of prolyl-tRNA synthetases / Ahel I., Stathopoulos C., Ambrogelly A. [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, №38. – P. 34743-34748.
101. Raunio R. Amino acid pool of *Escherichia coli* during the different phases of growth / Raunio R., Rosenqvist H. // Acta Chem. Scand. – 1970. – Vol. 24, №8. – P. 2737-2744.

102. Soini J. Norvaline is accumulated after a down-shift of oxygen in *Escherichia coli* W3110 / Soini J., Falschlehner C., Liedert C. [et al.] // *Microb. Cell Fact.* – 2008. – Vol. 7:30.
103. Beuning P.J. Species-specific differences in amino acid editing by class II prolyl-tRNA synthetase / Beuning P.J., Musier-Forsyth K. // *J. Biol. Chem.* – 2001 . – Vol. 276, №33. – P. 30779-30785.
104. Bunjun S. A dual-specificity aminoacyl-tRNA synthetase in the deep-rooted eukaryote *Giardia lamblia* / Bunjun S., Stathopoulos C., Graham D. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97, №24. – P. 12997-13002.
105. Stathopoulos C. Cysteinyl-tRNA synthetase is not essential for viability of the archaeon *Methanococcus maripaludis* / Stathopoulos C., Kim W., Li T. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98, №25. – P. 14292-14297.
106. Kamtekar S. The structural basis of cysteine aminoacylation of tRNA^{Pro} by prolyl-tRNA synthetases / Kamtekar S., Kennedy W.D., Wang J. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100, №4. – P. 1673-1678.
107. Wong F. Functional role of the prokaryotic proline-tRNA synthetase insertion domain in amino acid editing / Wong F.C., Beuning P.J., Nagan M. [et al.] // *Biochemistry.* – 2002. – Vol. 41, №22. – P. 7108-7115.
108. Bartholow T. Strictly conserved lysine of prolyl-tRNA Synthetase editing domain facilitates binding and positioning of misacylated tRNA(Pro.) / Bartholow T.G., Sanford B.L., Cao B. [et al.] // *Biochemistry.* – 2014. – Vol. 53, №6. – P. 1059-1068.
109. Kumar S. Substrate specificity of bacterial prolyl-tRNA synthetase editing domain is controlled by a tunable hydrophobic pocket / Kumar S., Das M., Hadad C.M., Musier-Forsyth K. // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, №5. – P. 3175-3184.
110. Birnboim H.C. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA / Birnboim H.C., Doly J. // *Nucleic. Acids. Res.* – 1979. – 7, №6. – P. 1513-1523.

111. Laemmli U.K. Cleavage proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / Laemmli U.K. // *Nature*. – 1970. – 227, №5259. – P. 680–685.
112. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* – 1976. – 72, -- P. 248-254.
113. Meinnel T. Fast purification of a functional elongator tRNA^{met} expressed from a synthetic gene in vivo / Meinnel T., Mechulam Y., Fayat G. // *Nucl. Acids Res.* – 1988. – Vol. 16, №16. – P. 8095-8096.
114. Sherlin L. Chemical and enzymatic synthesis of tRNAs for high-throughput crystallization / Sherlin L.D., Bullock T.L., Nissan T.A. [et al.] // *RNA*. – 2001. – Vol. 7, №11. – P. 1671-1678.
115. Milligan J. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA-polymerase and synthetic DNA templates / Milligan J.F., Groebe D.R., Witherell G.W., Uhlenbeck O.C. // *Nucl. Acids Res.* – 1987. – Vol. 15, №21. – P. 8783-8798.
116. Taira K. Construction of a novel RNA-transcript-trimming plasmid which can be used both in vitro in place of run-off and (G)-free transcriptions and in vivo as multi-sequences transcription vectors / Taira K., Nakagawa K., Nishikawa S., Furukawa K. // *Nucl. Acids Res.* – 1991. – Vol. 19, №19. – P. 5125-5130.
117. Kim I. Rapid purification of RNAs using fast performance liquid chromatography (FPLC) / Kim I., McKenna S.A., Puglisi E.V., Puglisi J.D. // *RNA*. – 2007. – Vol. 13, №2. – P. 289-294.
118. Shields T. High-performance liquid chromatography purification pf homogenous-length RNA produced by trans cleavage with a hammerhead ribozyme / Shields T.S., Mollova E., Marie L.S. [et al.] // *RNA*. — 1999. – Vol. 5, №9. – P. 1259-1267.
119. Price S. Crystallization of RNA Protein complexes I. Methods for the large-scale preparation of RNA suitable for crystallographic studies / Price S.R., Ito N., Oubridge C. [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 249, №2. – P. 398-408.

120. Liu H. Molecular recognition of tRNA^{Pro} by *Escherichia coli* proline tRNA synthetase in vitro / Liu H., Peterson R., Kessler J., Musier-Forsyth K. // Nucl. Acids Res. – 1995. – Vol. 23, №1. – P. 165-169.
121. Tamura K. Identity elements of *Escherichia coli* tRNA(Ala) / Tamura K., Asahara H., Himeno H. [et al.] // J. Mol. Recognit. – 1991. – Vol. 4, №4. – P. 129-132.
122. Musier-Forsyth K. Specificity for aminoacylation of an RNA helix: an unpaired, exocyclic amino group in the minor groove / Musier-Forsyth K., Usman N., Scaringe S. [et al.] // Science. – 1991. – Vol. 253, №5021. – P. 784-786.
123. Easterbrook-Smith S. Pyruvate carboxylase: affinity labelling of the magnesium adenosine triphosphate binding site / Easterbrook-Smith S., Wallace J., Keech D. // Eur. J. Biochem. – 1976. – Vol. 62, №1. – P. 123-130.
124. Liu H. *Escherichia coli* proline tRNA synthetase is sensitive to changes in the core region of tRNA(Pro) / Liu H., Musier-Forsyth K. // Biochemistry.— 1994.— Vol. 33, №42.— P. 12708-12714.
125. Dulic M. Determinants for tRNA-dependent pretransfer editing in the synthetic site of isoleucyl-tRNA synthetase / Dulic M., Perona J.J., Gruic-Sovulj I. // Biochemistry.— 2014.— Vol. 53, №39.— P. 6189-6198.
126. Cvetesic N. Kinetic partitioning between synthetic and editing pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases occurs at both pre-transfer and post-transfer hydrolytic steps / Cvetesic N., Perona J.J., Gruic-Sovulj I. // J. Biol. Chem.— 2012.— Vol. 287, №30.— P. 25381-25394.
127. Boyarshin K.S., Priss A.E., Rayevskiy A.V., Ilchenko M.M., Dubey I.Y., Kriklivyi I.A., Yaremchuk A.D., Tukalo M.A. A new mechanism of post-transfer editing by aminoacyl-tRNA synthetases: catalysis of hydrolytic reaction by bacterial-type prolyl-tRNA synthetase. J. Biomol. Struct. Dyn.- 2016.- DOI: 10.1080/07391102.2016.1155171.
128. So B. Substrate-mediated fidelity mechanism ensures accurate decoding of proline codons / So BR, An S, Kumar S, Das M, Turner DA, Hadad CM, Musier-Forsyth K. // J Biol Chem.— 2011.— Vol. 286, №36.— P. 31810-31820.

129. Kovalenko O., Participation of tRNA^{Leu} A76 hydroxyl groups in tRNA-dependent editing by *Thermus thermophilus* leucyl-tRNA synthetase / Kovalenko O., Yaremchuk A., Tukalo M. // International conference on aminoacyl-tRNA synthetases: from basic mechanisms to system biology, 7-9 September 2008, Verier du Lac, France. Abstr. P. 12.
130. Gruic-Sovulj I. tRNA-dependent aminoacyl-adenylate hydrolysis by a nonediting class I aminoacyl-tRNA synthetase / Gruic-Sovulj I, Uter N, Bullock T, Perona JJ. // J Biol Chem.— 2005.— Vol. 280, № 25.— P. 23978-23986.
131. Minajigi A. RNA-assisted catalysis in a protein enzyme: The 2'-hydroxyl of tRNA(Thr) A76 promotes aminoacylation by threonyl-tRNA synthetase / Minajigi A., Francklyn C.S. // Proc Natl Acad Sci U S A.— 2008.— Vol. 105, № 46.— P. 17748-17753.
132. Weinger J. Substrate-assisted catalysis of peptide bond formation by the ribosome / Weinger JS, Parnell KM, Dorner S, Green R, Strobel SA. // Nat Struct Mol Biol.— 2004.— Vol. 11, № 11.— P. 1101-1106.
133. Kuhlenkoetter S. Different substrate-dependent transition states in the active site of the ribosome / Kuhlenkoetter S, Wintermeyer W, Rodnina MV. // Nature.— 2011.— Vol. 476, № 7360.— P. 351-354.
134. Reese C. Acyl Migration in Ribonucleoside Derivatives / Reese C.B., Trentham D.R. // Tetrahedron Lett.— 1965.— № 29.— P. 2467-2472.