

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

РАЄВСЬКИЙ ОЛЕКСІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК: 577.217:57.012:577.11

**МОЛЕКУЛЯРНА ДИНАМІКА КОМПЛЕКСІВ ЛЕЙЦИЛ-ТРНК-
СИНТЕТАЗ БАКТЕРІАЛЬНОГО ТА АРХЕЙНОГО ПОХОДЖЕННЯ ІЗ
ПОМИЛКОВО СИНТЕЗОВАНИМИ ПРОДУКТАМИ РЕАКЦІЇ
АМІНОАЦИЛЮВАННЯ**

03.00.03 – молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертація є рукописом

Робота виконана у відділі ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології та генетики НАН України (м. Київ)

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України
Тукало Михайло Арсентійович,
директор Інституту молекулярної біології і
генетики НАН України, завідувач відділу
ензимології білкового синтезу.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Сиволоб Андрій Володимирович,
ННЦ "Інститут біології та медицини"
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка, професор кафедри
загальної та медичної генетики;

доктор хімічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Вовк Андрій Іванович,
директор Інституту біоорганічної хімії та
нафтохімії
ім. В. П. Кухаря НАН України, завідувач
відділу механізмів біоорганічних реакцій.

Захист відбудеться 22 жовтня 2019 року о 10.30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України на адресу: 03143, м. Київ, вул. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики Національної Академії Наук України на адресу: (03680, м. Київ, вул. Заболотного, 150).

Автореферат розіслано 21 вересня 2019 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук, с.н.с.

І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. У процесі біосинтезу білка здійснюється переклад (трансляція) генетичної інформації у послідовність амінокислотних залишків у молекулі білка. В еволюційному процесі формування відповідності між кодонами мРНК та амінокислотними залишками поліпептидного ланцюга, що синтезується, відбувалась дивергенція аміноацил-тРНК синтетаз (АРСаз) та зростання їхньої специфічності (Ibba & Soll, 2000; Yadavalli & Ibba, 2012). Спеціалізація кожного з цих ферментів на упізнаванні однієї конкретної амінокислоти досягла рівня «надспецифічності» (Giegé & Eriani, 2009). Цей рівень забезпечується, зокрема, функцією редагування (Fersht & Dingwall, 1979).

АРСази використовують цілий набір редагувальних механізмів, а їх різноманітність відображає еволюційний шлях становлення генетичного коду і зростання точності білкового синтезу (Yadavalli & Ibba, 2012). Важливим є те, чи механізм редагування має місце до переносу амінокислоти на тРНК, чи після (Palencia et al., 2012). Редагування помилок АРСазами на етапі відбору амінокислот або пре-трансферне редагування – це специфічний гідроліз продуктів, що виникли внаслідок зв'язування ферментом помилкової амінокислоти (Lincicum et al., 2003). В той же час, редагування може відбуватися вже після зв'язування амінокислоти із тРНК – так зване пост-трансферне редагування (Dulic et al., 2010).

Саме цей посттрансферний процес гідролізу помилкових кінцевих продуктів – аміноацил-тРНК – викликає найбільшу зацікавленість. Зокрема, є приклади глибоких функціональних відмінностей в роботі гомологічних ферментів, отриманих з різних організмів. Це стосується тріади лейцинової, валінової та ізолейцинової синтетаз. Особливу роль відіграє саме лейцил-тРНК синтетаза (LeuRS), яка виключає ймовірність потраплення абіогенної амінокислоти в ново синтезовані протеїни. Це дає потенційну можливість використання речовин, які блокують редагувальні активні центри АРСаз, в якості протимікробних препаратів (Rock et al., 2015). Також дані про механізми редагування можуть бути застосовані при розробці систем для синтезу штучних білків, що включають неканонічні амінокислотні залишки. І взагалі, характеристика та детальний опис механізмів редагування є одним із кроків до розуміння ранніх етапів розвитку життя.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відділі ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України відповідно з планами науково-дослідної роботи відділу у рамках бюджетних тем та наукових грантів: “Вивчення молекулярних механізмів корекційної активності аміноацил-тРНК синтетаз” (2005-2009 рр., державний реєстраційний номер 0105U003263), “Вивчення молекулярних основ точності трансляції генетичного коду в процесі утворення аміноацил-тРНК”. (2010-2014 рр., державний реєстраційний номер, 0109007245), “Адаптивна трансляція і механізми корекції помилок аміноацил-тРНК синтетазами *in vitro* та *in vivo*” (2015-2019 рр., державний реєстраційний номер 0114U006257), “Нові підходи до мішень-спрямованого пошуку

потенційних протипухлинних та протиінфекційних засобів для подолання проблеми резистентності до ліків“ (2017–2021 рр., державний реєстраційний номер 0117U000204), “Патології людини: від молекулярного до клітинного рівня“ (2013-2017рр., державний реєстраційний номер 0113U002831), “Мішень-спрямований пошук інгібіторів аміноацил-тРНК синтетаз із селективною дією проти збудників інфекційних хвороб людини“ (2015-2019, державний реєстраційний номер 0115U002945).

Ресурсоємні дослідження виконано в рамках роботи ВО MolDynGrid (<http://moldyngrid.org>), що є частинами Українського національного ґриду (<http://ung.in.ua/>) та Європейської ґрид-інфраструктури (<https://www.egi.eu/>).

Мета і завдання дослідження. Змодельовати і дослідити всі ланки процесу аміноацилювання та редагування на прикладі LeuRS із двох різних видів організмів бактеріального та архейного типів (*Thermus thermophilus*, *Pyrococcus horikoshii*), використовуючи методи обчислювальної біології.

Для досягнення цієї мети було поставлено наступні завдання:

1. Провести аналіз доступних кристалічних структур LeuRS із *Thermus thermophilus*, *Pyrococcus horikoshii* та їх гомологів і підготувати повноцінні білково-нуклеїнові комплекси, придатні до наступного аналізу.

2. Провести молекулярний докінг субстратів пре-трансферного редагування в аміноацилювальний сайт LeuRS з *T.thermophilus* та пост-трансферного редагування – в активний сайт редагувальних доменів LeuRS *T.thermophilus* та *P.horikoshii*.

3. Визначити найбільш коректні параметри топології субстратів та провести молекулярну динаміку для отримання інформації про взаємодію всіх типів лігандів з амінокислотними залишками аміноацилюючого та редагувальних сайтів.

4. Дослідити та проаналізувати структурні передумови забезпечення специфічності взаємодії різних лігандів пре- та пост-трансферного редагування із активними сайтами АРСаз.

5. Передбачити та описати механізм реакції гідролізу пре-трансферних та пост-трансферних субстратів.

Об'єкт дослідження: лейцил-тРНК синтетази бактеріального та архейного типів.

Предмет дослідження: аміноацилювальна та редагувальна активність LeuRS еубактеріального та архейного типів.

Методи дослідження. Реконструкція білково-нуклеїнових комплексів, гнучкий молекулярний докінг, методи молекулярної динаміки, аналіз та інтерпретація енергії зв'язування лігандів, аналіз геометрії передреакційних комплексів.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше реконструйовано повноцінні моделі білково-нуклеїнових та ліганд-білкових комплексів бактеріальної LeuRS із *T.thermophilus*. На основі отриманих даних побудована модель LeuRS архейного типу (*Pyrococcus horikoshii*) з подальшим прогнозом механізму редагування. Встановлено природу відмінності в аміноацилюванні і

редагуванні різних субстратів. Для відпрацювання методу створено окрему модель взаємодії ССА-кінця тРНК і димеру ProRS при пост-трансферному редагуванні та порівняно із біохімічними даними. Розроблена і валідована методологія отримання параметрів складних біологічних, а власне, органічних структур, що не входять у стандартний набір бібліотек біоінформатичних програм.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані і моделі можуть бути використані для вивчення ефекту мутацій в досліджуваних системах та створення ортогональних пар тРНК-АРСаза з метою включення неканонічних амінокислот. У свою чергу, відпрацьовані методи можуть бути застосовані для інших представників родини аміноацил-тРНК синтетаз. Дані про механізм пост-трансферного редагування можуть бути використані для дослідження захворювань, що викликані помилками при трансляції, та при розробці потенційних препаратів проти певних мікроорганізмів.

Особистий внесок здобувача. У процесі виконання дисертаційної роботи автором проведено низку комп'ютерних моделювань, націлених на створення повнорозмірних комплексів, що включають білок, тРНК та ліганд. Виконано віртуальний скринінг бібліотек низькомолекулярних сполук, розроблено систему параметризації вхідних файлів, розраховано молекулярну динаміку АРСаз та її комплексів з лігандами, визначено різницю енергій зв'язування та оцінено ступінь рухливості амінокислотних залишків, здійснено параметризацію програм молекулярного докінгу та молекулярної динаміки. Здобувачем особисто проведено порівняльний аналіз результатів МД та аналіз молекулярних комплексів, що отримані гнучким докінгом. Автор висловлює вдячність науковому керівнику та іншим співавторам опублікованих наукових робіт та колегам за участь в їх обговоренні та узагальненні отриманих результатів.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи були представлені та обговорені на 4th International symposium "Methods and applications of computational chemistry" (28 June-2 July 2011, Lviv, Ukraine); VIIIth Parnas Conference (August 27-31, 2011, Warsaw, Poland); X міжнародній науковій конференції студентів та молодих науковців (19-23 березня 2012, м. Київ); 9th International symposium on aminoacyl-tRNA synthetases (October 6-11 Hakone, Japan); 38th FEBS Congress (July 6-11, 2013, St. Peterburg, Russia); FEBS 13th Young Scientists Forum, (2013, St. Peterburg); XI Українського біохімічного конгресу, Ukr. Biochem. J. (2014); 19-той Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых "Биология-наука XXI века" (Пушино 2015); IXth International meeting "From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies" (19-22 September 2016 Lviv, Ukraine); 42ND FEBS Congress From Molecules To Cells And Back (10-14 September, 2017, Jerusalem, Israel); на EMBO Workshop: «Enzyme, biocatalysis and chemical biology: The new frontiers» (09-12 September 2018, Pavia, Italy); 27th tRNA Conference (23-28 September 2018, Strasbourg, France).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 5 статей у фахових виданнях (з яких всі входять до наукометричної бази даних Scopus) і 13 тез у збірниках закордонних і вітчизняних з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження, які викладено у чотирьох розділах, аналізу та узагальнення результатів роботи, висновків та списку використаних джерел, який налічує 100 найменування та додатків. Дисертація містить 31 рисуноків та 6 таблиць. Загальний обсяг дисертації складає 147 сторінок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У першому розділі (огляд літератури) розглянуто сучасний стан досліджень аміноацил-тРНК синтетаз. Окрему увагу зосереджено на зв'язку структурної організації ензимів та функціональної ролі їх доменів. Узагальнено літературні дані, що стосуються механізмів взаємодії аміноацил-тРНК синтетаз із субстратами та реакцій, що каталізують ензими цього класу. А саме, детально розглянуто сучасні дані про утворення інтермедіатів під час аміноацилювання та кінцевих продуктів реакцій у аміноацилювальному (пре-трансферне редагування) та редагувальному (пост-трансферне редагування) сайтах зв'язування. У ході аналізу літератури виявлено відсутність точної інформації щодо структурних аспектів забезпечення специфічності при селективному відборі споріднених амінокислот та механізму редагування помилково синтезованих продуктів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

При аналізі баз даних було визначено ряд структур, що задовольняють поставленим завданням. Так, для лейцинової системи еубактеріального типу використовувалися 4 кристалічні структури [2V0G, 1OBC, 1OBN, 2BTE], для архейного – лише дві із доступних [1WZ2, 1WKV], а при вивченні пролінової системи – одна структура [2J3M]. Усі роботи щодо використання результатів аналізу послідовностей, відбудови делецій або зміни конформацій проводилися за допомогою скриптів програмного пакету Modeller 9v7. Модифікацію положень акцепторного стебла тРНК із *P. horikoshii* та *E. faecalis* було зроблено із залученням програмного пакету Sirius та серверу 3DNA (Lu & Olson, 2008).

Структури субстратів будувалися в середовищі програми Marvin Sketch. Для параметризації цвіттеріонів та аміноациладенілатів ми використали програму Antechamber із пакету AmberTools (Case et al., 2012). Молекули аміноацилів були параметризовані завдяки серверу R.E.D.III та відвалідовані шляхом аналізу траєкторій молекулярної динаміки.

У програмі PyMol було зроблено 8 окремих моделей для подальшої роботи: повні структури LeuRS з *T. Thermophilus* (LeuRSTt) та *P. horikoshii* (LeuRSPh) у

комплексі із тРНК (967 та 876 залишки); два обрізаних активних центри (813 та 804 залишки); повнорозмірна димерна структура ProRS із *E. Faecalis* (ProRSEf). Для проведення релаксації використовувався програмний пакет GROMACS 4.5 та силове поле Amber99p (Hess et al., 2008; Berendsen, Spoel, & van Drunen, 1995). Використовувалось силове поле Amber, яке є повноатомним силовим полем і було розроблене для моделювання білків та нуклеїнових кислот. Для отримання інформації щодо поведінки лігандів та амінокислот сайту в процесі молекулярної динаміки використовувався набір внутрішніх інструментів для аналізу траєкторій.

Кристалічні та біохімічні дані використовувались для інтерпретації розширених опцій під час докінгу в програмі HADDOCK [Dominguez, Boelens & Bonvin, 2003]. Прогнози результату HADDOCK були отримані ще до запуску і власне на них формувалися «обмеження/примушення» для докінгу. За допомогою програмного пакету PyMol та серверу FT-MAP, що працює за принципом зондування поверхні білка кільцевими та гексагональними структурами, ми отримали передбачення щодо розташування 3'кінця ланцюга тРНК (Ngan et al., 2012). Після отримання релаксованих структур та сукупності лігандів наступним кроком стала параметризація процесу докінгу. Задля цієї мети було задіяне програмне забезпечення Gold 5.0 CCDC (Verdonket al., 2003.). Використовуючи сервіси віртуальної лабораторії MolDynGrid (Salnikov et al., 2010) розрахунки також проводились в ґрід-середовищі, використовуючи обчислювальні кластери Українського національного ґрїду. Зокрема було використано кластер Інституту кібернетики НАН України (кластер SCIT), Національного технічного університету України «КПІ» (кластер KPI), Інституту молекулярної біології та генетики НАН України (кластер IMBG), Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України (кластер ISMA), Інституту фізики НАН України (кластер IOP).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення молекулярних основ специфічності LeuRS по відношенню до амінокислоти та можливих механізмів пре-трансферного редагування. Для пошуку можливих положень амінокислот в аміноацилювальному сайті LeuRSt ми використовували молекулярний докінг. Вісім комплексів, що включали LeuRSt, AMP та амінокислоту із ряду лейцин (Leu), норвалін (Nva), гомоцистеїн (Hcys), норлейцин (Nle), метіонін (Met), цистеїн (Cys), ізолейцин (Ile) та валін (Val), були досліджені під час експерименту.

На рис. 1 представлені візуальні відмінності між деякими комплексами щодо відстані між киснем карбоксилу амінокислот та фосфатною групою AMP, а також просторової орієнтації карбоксильних груп – параметрів, від яких залежить утворення ангідридного зв'язку. Окрім того особливу увагу було приділено наявності водневих зв'язків між аміногрупою субстрату та карбоксильними групами Asp80 та Phe41.

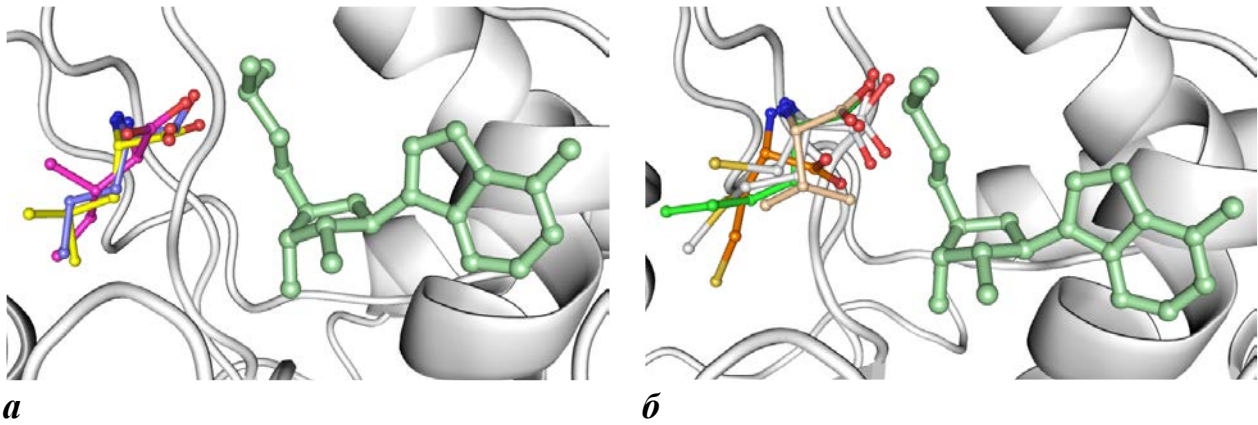


Рис. 1. Результати докінгу молекул лейцину (жовтий), норваліну (блакитний), ізолейцину (рожевий) (а) та ряду подібних амінокислот (б): валін (жовтий), цистеїн (білий), гомоцистеїн (сірий), метіонін (помаранчевий), норлейцин (зелений) в аміноацилювальний сайт зв'язування LeuRS із молекулою АМР в якості другого субстрату

Оцінка конформації субстрату проводилась за результатами подвійної оціночної функції GoldScore та ASP (табл. 1). Значення функції GoldScore є безрозмірною величиною, що відповідає сумі внесків енергії водневих зв'язків, внутрішньо-молекулярних зв'язків, ван-дер-вальсових взаємодій та стеричних умов. Емпіричні значення ASP функції відображають відповідність між згенерованою конформацією і набором експериментально отриманих параметрів для всіх груп атомів.

Таблиця 1

Результат докінгу амінокислот (aa) в аміноацилювальний сайт LeuRSTt в присутності АМР

Субстрат	GScore	ASP
Methionine	46.3	10.1
Cysteine	40.6	7.9
Isoleucine	44.1	6.4
Valine	37.8	5.3
Leucine	56.7	22.3
Norvaline	52.2	15.3
Hcysteine	50.5	15.3
Norleucine	48.2	10.5

Незважаючи на ряд обмежень, щодо використання результатів докінгу для передбачення біологічного ефекту, отримані результати добре співвідносяться із експериментальними даними по першій стадії аміноацилювання. Для LeuRS із *E.coli* було виведено певну тенденцію на основі швидкості активації амінокислот: Leu > Nva > Hcy > Nle > Met > Ile (Cvetesic et al., 2014), а у випадку LeuRS із термофільної бактерії *Aquifex aelicus*, в наступному порядку: Leu > Nva > Met > Ile (Zhu et al., 2009)

Моделювання МД виконувалось протягом 5нс. Ступінь "спорідненості" для субстрату був передбачений на основі його стабільного положення під час МД, відстані між його атомами та амінокислотним середовищем, тобто здатністю утворювати водневі зв'язки та на основі значень кулонівської енергії (Ван дер Ваальсові взаємодії незначні для подібних молекул). Частина амінокислот показала настільки нестабільні показники, що їх було виключено із подальшого дослідження через неможливість реакції аміноацилювання. Для амінокислот із досить стабільними показниками рухливості, енергій зв'язку та взаємної геометрії із AMP, а саме лейцину, норваліну та ізолейцину, аналіз показав суттєві відмінності (рис.2).

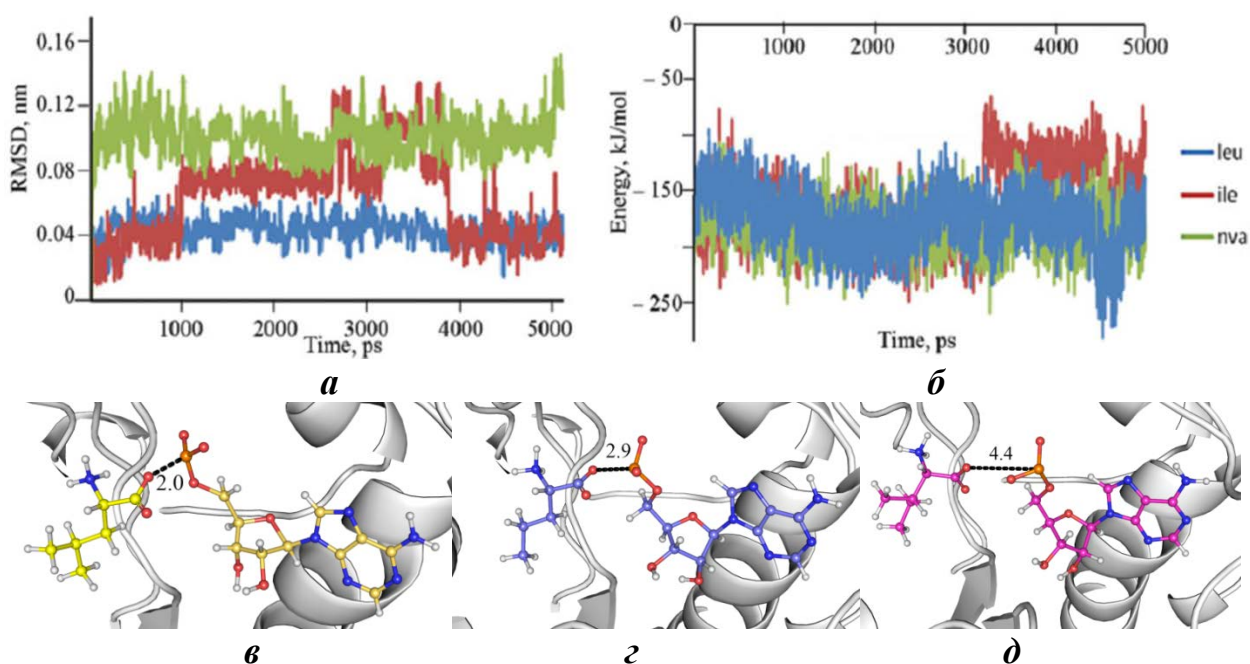


Рис. 2. Графіки RMSD (а) для амінокислотних субстратів та значення енергії електростатичної взаємодії (б) між субстратом та синтетазою (*LeuRStt*), розраховані протягом 5нс МД. Отримані усереднені геометрії амінокислот та AMP для Leu (в), Nva (з) та Ile (д)

Молекула лейцину була використана як референсний ліганд, оскільки вона є спорідненим субстратом аміноацилювання. Графік RMSD (рис. 2, а) показує зміщення атомів ізолейцину та підтверджує відмінний рівень стабільності ліганду у сайті зв'язування. Графік електростатичних взаємодій (рис. 2, б) між лігандами та синтетазою показує подібну тенденцію у зв'язуванні норваліну і лейцину із амінокислотним оточенням синтетичного сайту.

Результати корелюють із даними щодо швидкості утворення ізолейциладенілату при вивченні *LeuRS* з *E. coli*. Причини відмінностей у поведінці амінокислот-субстратів реакції аміноацилювання мають бути в жорсткості скелету ізолейцину та його великій площі поверхні, що унеможливорює швидкий перебіг реакції. Не дивлячись на те, що ізолейцин також зв'язується із Asp80, відстань до фосфатної групи AMP досить велика.

Виходячи з отриманих даних по можливості утворення аміноациладенілатів із лейцину, норваліну та ізолейцину, ми провели дослідження для продуктів реакції (аміноациладенілатів) шляхом використання молекулярного докінгу та динаміки (табл. 2). Це дозволило зрозуміти механізм зв'язування та захисту від гідролізу споріднених пре-трансферних субстратів у сайті аміноацілювання *LeuRStt*.

Таблиця 2

Результат докінгу аміноациладенілатів (aa-AD) в аміноацілювальний сайт *LeuRStt*

<i>Субстрат</i>	<i>Gscore</i>	<i>ASP</i>
Methionyl-AD	90.6	40.8
Cysteyl-AD	74.4	49
Isoleucyl-AD	70.9	41.6
Valyl-AD	72	35.1
Leucyl-AD	94.3	44.6
Norvalyl-AD	95.9	43.3
Нcysteyl-AD	84.4	40.8
Norleucyl-AD	87	41.1

На підставі цих результатів ми розпочали молекулярну динаміку для визначення змін внутрішньої енергії аміноациладенілату, яку можна оцінити, спостерігаючи за його конформаціями. Молекулярна динаміка лейцил-, ізолейцил- та норваліладенілатів показала, що найбільш стійким і конформаційно вигідним є лейциладенілат (рис. 3). Цей порядок можна пояснити внутрішнім напруженням аміноациладенілатів під час знаходження в аміноацілювальному сайті, яке впливає на конформацію або форму амінокислоти (Cvetesic et al., 2014).

Tyr43 активного сайту екранує карбоксильну групу лейцину та норваліну, подібно до щита, і відхиляється у разі присутності ізолейцину. Це відхилення відбувається через вигин радикалу ізолейцину і дозволяє молекулам води проводити нуклеофільну атаку Ile-AD за участі амідної частини Glu540 (рис. 3). Це може бути одним із механізмів пре-трасферного редагування в аміноацілювальному сайті синтетаз (Rayevsky & Tukalo, 2016). Обидві молекули, Leu-AD та Nva-AD, утворюють зв'язок із Asp80 та екрановані фенольним кільцем Tyr43, а орієнтація карбонільної групи є не вигідною для атаки з іншого боку. Tyr43 разом із Pro42 утворює консервативний мотив PY, який зустрічається у групи LeuRS/IleRS/ValRS. Наш підхід добре корелює із недавніми даними, які показують, що заміщення висококонсервативного тирозину (Tyr59) на треонін в синтетичному сайті IleRSEc впливає як на редагування, так і на аміноацілювання (Cvetesic et al., 2016).

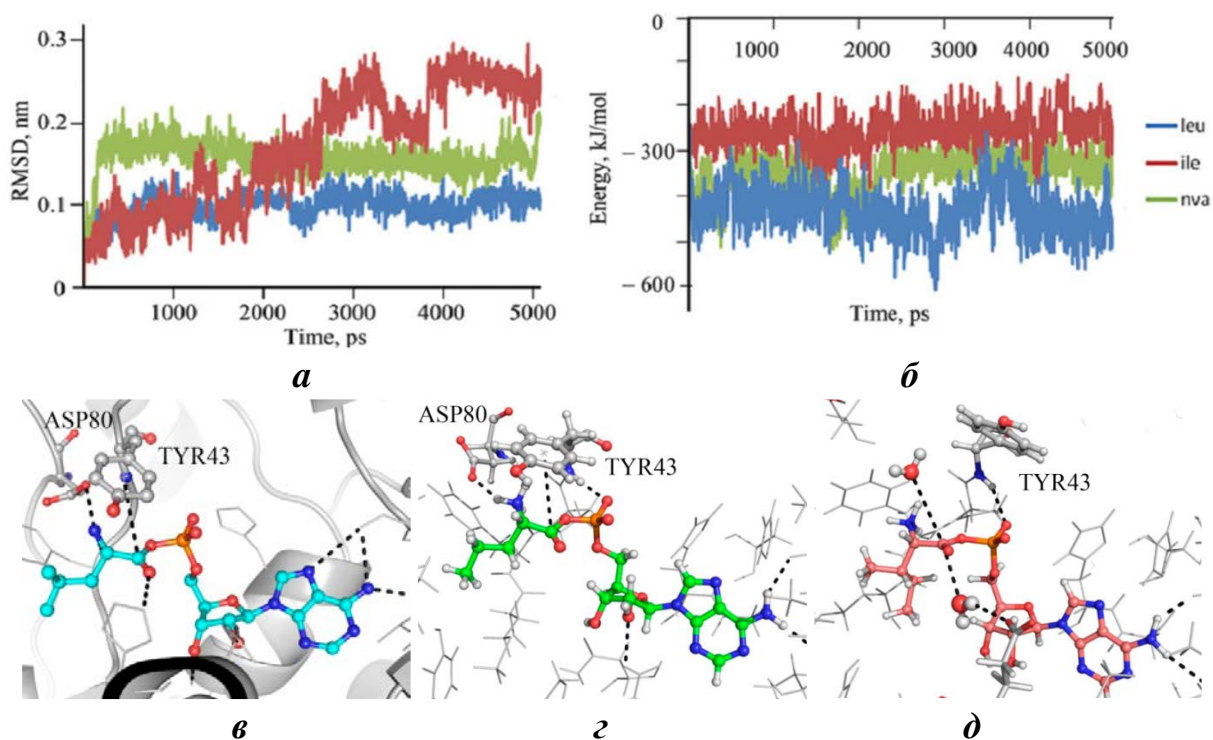


Рис. 3. Графіки RMSD (а), розраховані для аміноациладенілатів, та флуктуацій енергії електростатичних взаємодій (б) між лігандом та синтетазою (LeuRSt) протягом 5 нс МД. Естерний зв'язок молекули Leu-AD після 2 нс молекулярної динаміки екранується Tyr43 від нуклеофільної атаки (в). Одна із стабільних конформацій Nva-AD (г) та Ile-AD (д), що показує захищеність Nva-AD та доступність карбонільного вуглецю Ile-AD для атаки водою

Валідація методів вивчення механізмів пост-трансферного редагування. Перед проведенням основних досліджень, запропонована методика була перевірена на двох системах – лейциновій і проліновій – з різних організмів, спираючись на експериментальні дані. Результати моделювання порівнювались із біохімічними даними щодо редагувальної активності пролінової APCази.

Для симуляції LeuRS-Leu-tRNA^{Leu} із тРНК у стані пост-трансферного редагування ми використовували білок дикого типу та мутант T252A, застосували процедуру R.E.D.III визначення зарядів та альтернативний метод простого поєднання топології, описаний у статті Nagivara et al. На сьогодні показано, що наявність мутації дозволяє ензиму редагувати споріднений субстрат Leu-tRNA^{Leu} (Richard et al., 2001; Dulic et al., 2017). Таким чином, можна було порівняти поведінку субстрату за відсутності та наявності мутації та порівняти результати моделювання із відомими експериментальними даними.

Протокол підготовки, запуску та аналізу результатів молекулярної динаміки було відпрацьовано спираючись на результати біохімічних експериментів для систем LeuRS з *T.thermophilus* (I клас синтетаз) та ProRS з *E.faecalis* (II клас синтетаз). Здатність субстратів зв'язуватись із сайтом пост-трансферного редагування була перевірена шляхом порівняння енергій

взаємодій ліганду із амінокислотами сайту та підрахунку кількості міжмолекулярних водневих зв'язків. У випадку використання R.E.D.III алгоритму конформація та наближення молекул води до складного естеру фрагмента лейцил-tРНК значно залежить від залишку в положенні 252 домену CP1. У WT молекула лейцил-tРНК слабо взаємодіє із Asp347 і Thr247, а бічний ланцюг лейцину знаходиться поза сайтом зв'язування. У той же час мутація T252A створює додатковий простір, достатній для розташування лейцину та відповідної орієнтації площини зв'язку естеру (рис. 4). Для моделі Leu-tRNA^{Leu}, параметризованої за допомогою R.E.D.III, водневі зв'язки з Thr247 і Thr248 збільшують ймовірність нуклеофільної атаки на карбонільний вуглець ліганду за рахунок стабілізації геометрії та зміщення хмари електронної густини. При цьому Asp347 міцно взаємодіє з аміногрупою субстрату, зменшуючи кількість ступенів свободи.

Водночас, метод простої комбінації топологій амінокислоти та нуклеотиду A76 виявився невідповідаючим потребам дослідження механізму, особливо через абсолютну подібність поведінки субстратів та неможливості інтерпретувати опубліковані біохімічні дані. Неправильний розподіл заряду у моделі, що була підготовлена за допомогою комбінації топології, викликає підвищене обертання амінокислотного радикала незалежно від залишку в положенні 252 та втрату взаємодії із Thr247. Застосування комбінованої топології N-лейцину з не кінцевим аденозином не виявило жодних суттєвих відмінностей у зв'язуванні Leu-tRNA^{Leu} ані в білку дикого, ані мутантного білків. Конформація Leu-tRNA^{Leu} залишалася майже незмінною протягом МД незалежно від наявності мутації, але кількість молекул води біля карбонільного вуглецю лейцину зросла у випадку мутантного домену. У той же час, при такому моделюванні Leu-tRNA^{Leu}, незалежно від наявності/відсутності мутації T252A, залишок Thr247, який, як було доведено, є критичним для процесу гідролізу, не утворював контактів з карбонільним киснем лейцину. Таким чином, навіть за наявності молекул води геометрія аміноацилу, створеного із існуючих топологій N-кінцевої амінокислоти та аденозину, погано відповідає вимогам реакції, відповідно до опублікованих біохімічних даних.

Щоб остаточно підтвердити якість результатів моделювання було проведено подібну роботу із Ala-tRNA^{Pro} в бактеріальній ProRS *E. faecalis*. Для постановки симуляції реакції було змодельовано структуру ProRS із *E. faecalis* у комплексі із tРНК в редагувальному положенні, що значно відрізняється від існуючих кристалічних структур. Власне, за результатами молекулярного докінгу різних субстратів та подальшою молекулярною динамікою молекули Ala-tRNA^{Pro} в редагувальному сайті ProRS було передбачено механізм редагування. Модель ProRSEf була розроблена на основі повнорозмірної кристалічної структури ProRSEf другого класу (Crepin et al., 2006) і відрізняється від представленої в літературі моделі Кумара і співавторів, яка представляє лише частину субстрату, 3'-CCA-Ala, пов'язану із вільним доменом INS (редагувальним доменом) (Kumar et al., 2012). Для моделювання механізму реакції деацильовання Ala-tRNA^{Pro} ензимом ProRSEf були використані

квантово-хімічні методи в поєднанні з молекулярною динамікою. Базуючись на отриманих в нашій лабораторії біохімічних даних, було вирішено відпрацювати розроблену модель для підтвердження правильної параметризації та демонстрації механізму гідролізу пост-трансферного субстрату аміноацилювання (рис. 4).

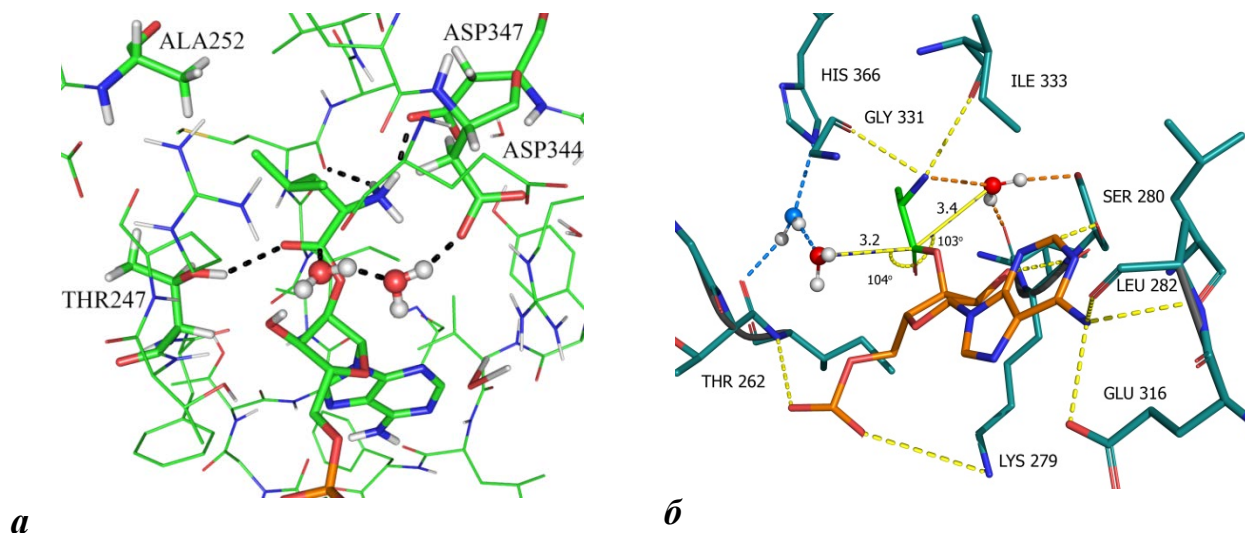


Рис. 4. Структури комплексів редагувальних доменів із *LeuRS* T252A із *Leu-tRNA^{Leu}* (а) та *ProRS* із *Ala-tRNA^{Pro}* (б). Позначено амінокислотні залишки, що беруть участь у зв'язуванні субстрату. Передреакційні стани демонструють можливість атаки активованою молекулою води та наявність водневих зв'язків

Детальний аналіз траєкторій молекулярної динаміки у програмі VMD показав, що водневі зв'язки між амінокислотами редагувальних доменів *LeuRS* та *ProRS* і атомами лігандів є досить стабільними. Було визначено усі можливі молекули води, що підходили до атомів карбонільного вуглецю та аміногрупи впродовж динаміки. За цими даними були відсіянні ті молекули, час знаходження яких біля зазначених атомів був мізерно малим для процесу реакції. Таким чином було вибрано крок динаміки, на якому дві молекули води утворювали необхідний кут 104-108° (кут Бюргі-Дуніца, Tamura, 2011). Наступною вимогою для реакції гідролізу є те, що молекула води повинна бути активована на відстані до 3.5Å від атома вуглецю та водневі зв'язки із білковим оточенням. Така конфігурація зберігалась протягом 50 пікосекунд, при цьому аміноацил у складі аміноацил-тРНК також перебував у вигідному положенні для атаки (Boyarshinet al., 2017).

Ключова роль 2'-ОН групи A76 в гідролізі *Ala-tRNA^{Pro}* підтверджується розрахунками DFT (Boyarshin et al., 2017). При цьому, 2'-ОН група і амінокислотний залишок обертаються, щоб знайти конформацію, яка може координувати карбонільну групу, що утворює стійку семичленну циклічну структуру. Це збільшує електрофільність вуглецю С=О групи і тим самим сильно полегшує нуклеофільну атаку молекули води.

Таким чином, було показано, що навіть за наявності молекул води геометрія аміноацилу, створеного із існуючих топологій N-кінцевої амінокислоти та аденозину, погано відповідає вимогам реакції, відповідно до опублікованих біохімічних даних.

Вивчення механізмів пост-трансферного редагування в спеціалізованих доменах APCаз різних організмів. Продемонструвавши якість розрахунку на проліновій синтетазі, ми продовжили дослідження на лейцинових синтетазах. Для вивчення структурних основ селективності редагувального домену *LeuRStt* з різними аміноацил-тРНК було проведено молекулярну динаміку повнорозмірних *LeuRS* із аміноацильованою тРНК (*Nva-tRNA^{Leu}* або *Ile-tRNA^{Leu}*) (рис. 5).

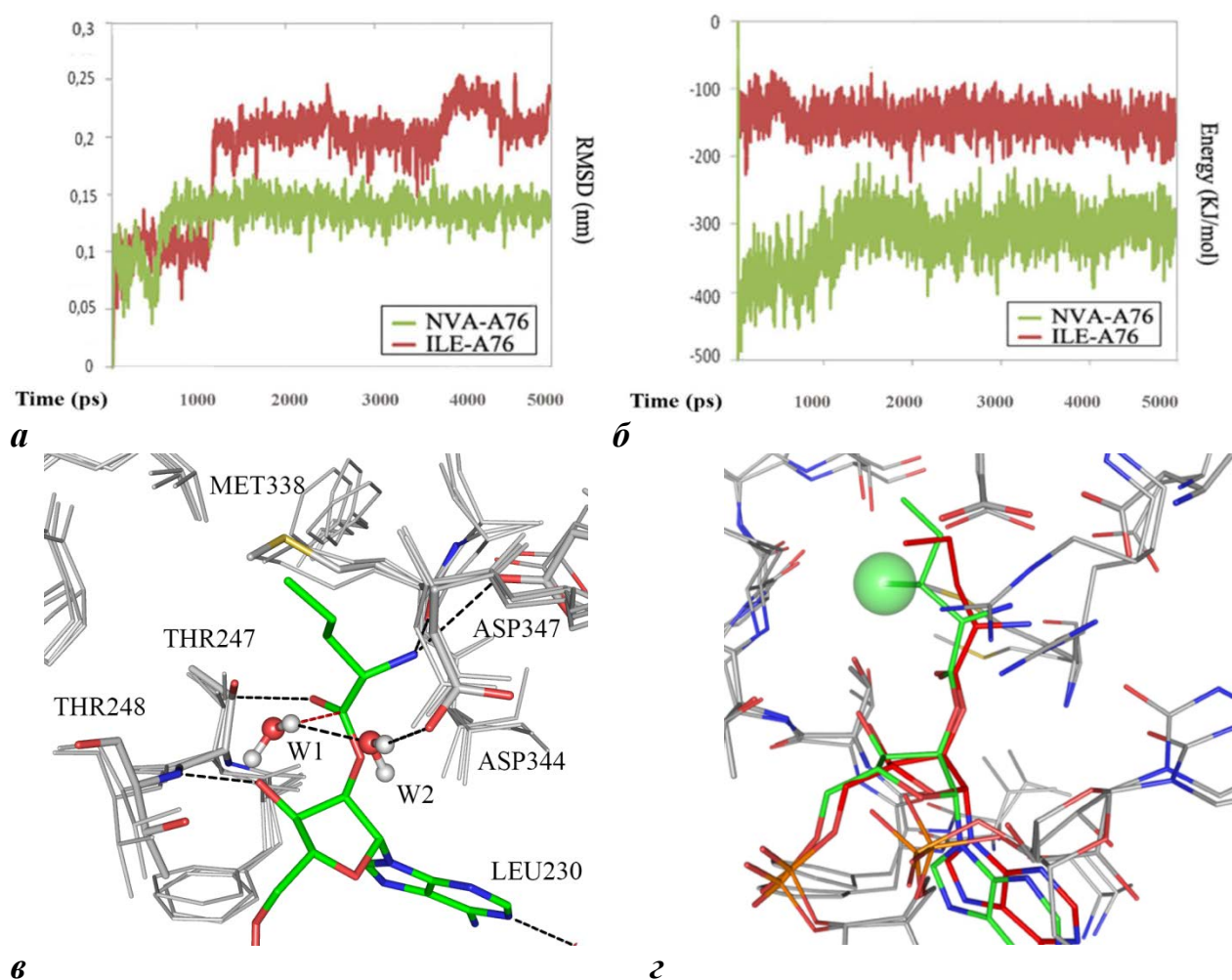


Рис. 5. Значення RMSD атомів лігандів (а) та кулонівські взаємодії (б) між атомами лігандів та амінокислотами редагувального сайту. Тривимірне вирівнювання декількох зрізів динаміки *Nva-A76* із CP1-доменом *LeuRStt* в присутності молекул води (в). Стеричні передумови бар'єру для води, створеного розгалуженим ланцюгом ізолейцину (показано сферою на зеленій молекулі *Ile-A76*), червоним кольором показано вихідну структуру *Ile-A76* після докінгу (г)

RMSD та електростатичні взаємодії аміноацильних фрагментів аміноацил-тРНК демонструють тенденцію до стабілізації саме Nva-A76 в редагувальному домені (рис. 5, *a*). Це може свідчити про те, що саме норвалін має проходити відсів на цьому етапі забезпечення точності аміноаціювання тРНК. Можна співставити показники пост-трансферного редагування для Ile-A76 із представленими даними по пре-трансферному редагуванню (рис. 3) для Ile-AD. Це в черговий раз підтверджує гіпотезу про те, що ізолейцин є субстратом пре-трансферного редагування.

Для розуміння механізму пост-трансферного гідролізу та специфічності відповідних пост-трансферних субстратів ми визначили розташування та контакти молекул води. На рис. 5 показано вирівнювання декількох кадрів протягом всієї МД, в якому молекули води присутні в необхідному положенні для атаки на карбонільну групу Nva-A76 (рис. 5, *b*), але відсутні протягом всієї молекулярної динаміки біля Ile-A76 (рис. 5, *c*).

Під час першої стадії реакції редагування утворюється проміжний продукт, коли гідроксильний аніон атакуючої молекули води (W1) приєднується до вуглецю, що зв'язаний із 2'-О тРНК, а протон через допоміжну молекулу води (W2) переходить на кисень Asp344. На другій стадії реакції протон із Asp344 через асистуючу молекулу води переходить на 2'-О тРНК. Потрібно наголосити, що в цьому процесі безпосередню участь приймають 3'-ОН група тРНК та гідроксильна група Thr247.

Наші результати моделювання показують, що, окрім конформаційної та енергетичної нестабільності Ile-A76 в сайті зв'язування, однією із причин зниження швидкості перебігу реакції гідролізу, може бути розгалужений бічний ланцюг. Власне, невігідна конформація ізолейцину фізично не дозволяє молекулам води наблизитися.

Показавши механізм у попередніх розрахунках, ми спробували краще зрозуміти структурні передумови селективності у відборі амінокислот в редагувальному домені і створили мутантну систему LeuRSTt (Asp347Ala, яка виключає процес гідролізу) і провели 5 нс молекулярну динаміку із використанням як Nva-A76, так і Ile-A76 в якості субстрату (Lincicum et al., 2007). Ефект мутації Asp347Ala на зв'язування Nva-A76 був проаналізований шляхом підрахунку міжмолекулярних водневих зв'язків, оцінці рухливості субстратів та енергії кулонівських взаємодій. Ці аналізи показали, що у нашій моделі мутація Asp347 негативно впливає на активність домену LeuRS (рис. 6).

Молекулярна динаміка мутантної форми LeuRSTt із критичною для реакції редагування заміною Asp347Ala, дозволила виявити цілу низку структурних відмінностей у зв'язуванні Nva- та Ile-tRNA^{Leu} із активним центром редагувального домену LeuRS, що може впливати на селективність під час гідролізу цих субстратів. Проведено аналіз сітки водневих зв'язків і у випадку Ile-tRNA^{Leu} частота утворення водневих зв'язків із Thr247/Thr248 набагато нижче, ніж для Nva-A76. Загалом, ці результати підтверджують результати подвійного мутагенезу LeuRS і, оскільки мутації Thr247 та Thr248 переважно впливають на кінетику реакції.

Важливою особливістю такого мутантного зв'язувального сайту є відсутність жорсткої орієнтації амінокислотного фрагмента аміноацилу. Як результат, ця модифікація визначає більш високий ступінь свободи для аліфатичного ланцюга Nva і Ile і, безсумнівно, створює більшу кількість можливих конформацій. При цьому жодна з молекул води не наближається до субстратів протягом молекулярної динаміки.

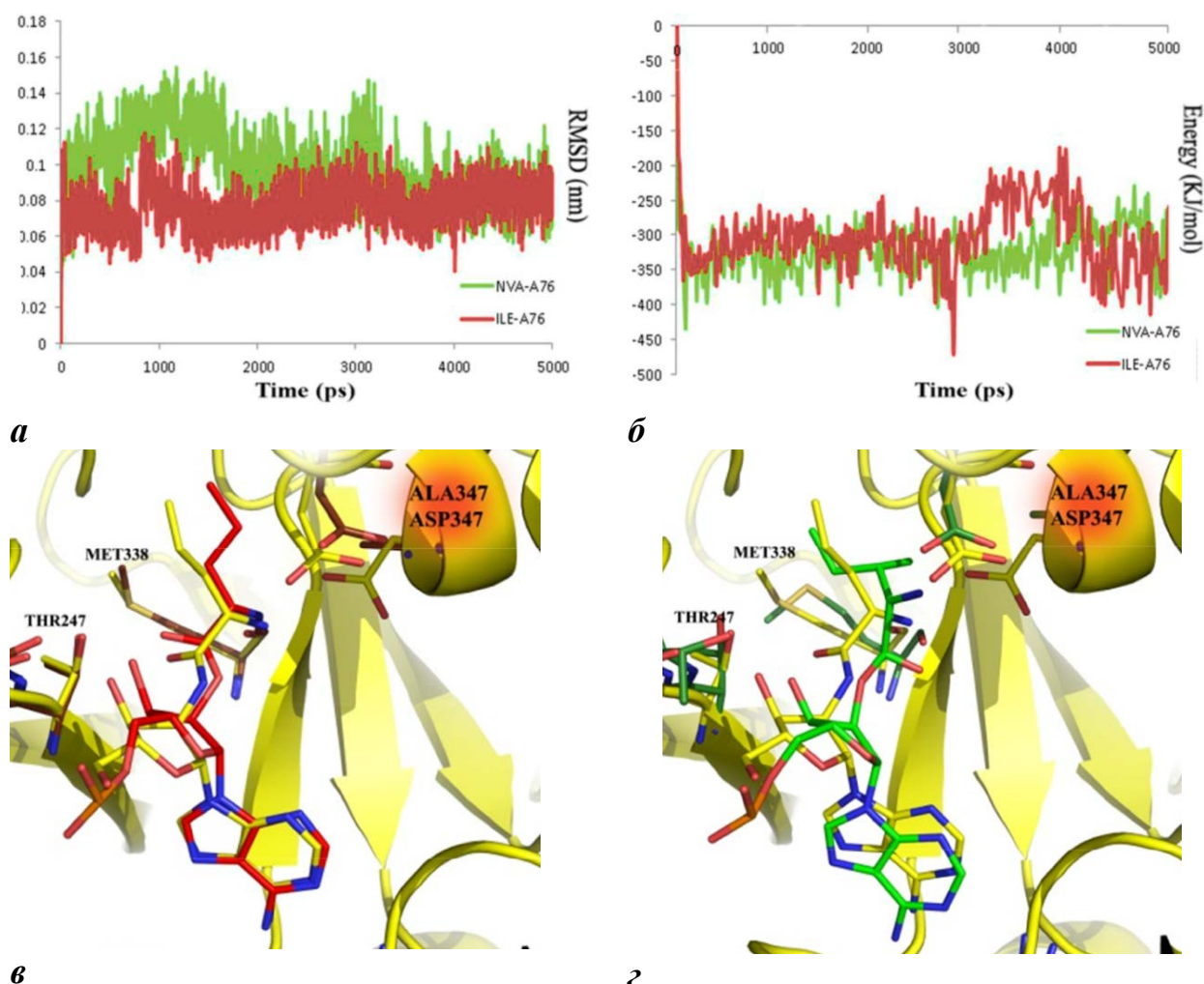


Рис. 6. Імовірний механізм ефекту мутації Asp347Ala. Показники рухливості та електростатичної енергії схожі між собою для обох субстратів (а, б). Мутація має значний вплив на конформацію Nva-аміноацилу, викликаючи зміни у розподілі сили зв'язування між амінокислотами сайту (зростаюча роль 247, 248, 338 замість 344 та 347). Зникнення Asp347 призводить до дезорієнтації Nva-A76 (в) і наступної втрати доступу молекул води. Так Ile-A76 втрачає зв'язок із карбонільною групою (г) та відчиняє вікно для атаки, із одночасною фіксацією через Asp344

На рис. 7 перераховані можливі молекулярні взаємодії між мутантним білком та лігандами, їх частота та активні групи, що їх формують. Цікаво, що для мутанта Asp347Ala два водневих зв'язки, утворені між OH групою Thr247 і CO-групою Ile-A76 та між NH групою Thr248 і 3'-ОН групою ліганду, мають дуже низький рівень стабільності, а саме 0,4 та 0,2 відповідно, у порівнянні із такими

ж показниками для Nva-A76. Це спостереження стало результатом кластеризації білок-лігандних структур, отриманих в результаті моделювання МД, та показало більшу нестабільність ліганду через відсутність карбоксильної групи Asp347. Друге спостереження позначило неможливість довготривалого розташування молекул води під необхідним кутом Бюргі-Дуніца до площини COO-групи (приблизно 1-2 пс на кожен молекулу води, що відповідає редагувальному стану).

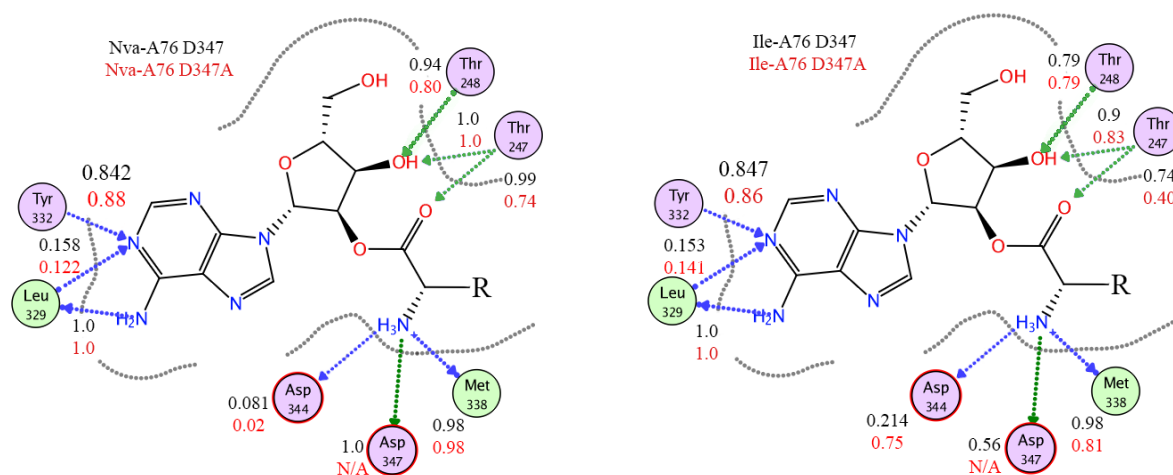


Рис. 7. Фармакофорні мапи зв'язків між аміноацил-тРНК та редагувальним сайтом та час їх існування в білках дикого та мутантного типу

Ці результати добре узгоджуються із експериментальними результатами для LeuRS із *E.coli*. Мутант Asp345Ala в синтетазі із *E.coli* (аналог Asp347Ala у LeuRSTt) продемонстрував значне зменшення швидкості деацилювання (на 4-5 порядків) як для Nva-tRNA^{Leu}, так і для Ile-tRNA^{Leu} (Dulic et al., 2018)

Молекулярна динаміка комплексу LeuRS-tRNA^{Leu} із *P.horikoshii* з пост-трансферним субстратом в редагувальному домені. Для порівняння механізмів гідролізу в бактеріальних та архейних LeuRS необхідно було провести таку ж процедуру для LeuRS^{Ph}. Через відсутність кристалографічних структур LeuRS^{Ph} у комплексі з пост-трансферними лігандами та комплексу LeuRS-tRNA в редагувальному стані, необхідно було спочатку визначити, які амінокислотні залишки беруть участь у зв'язуванні субстрату, крім того, розрахувати ймовірну локалізацію 3'-кінця тРНК у CP1 домені. Для побудови моделі архейних LeuRS в стані пост-трансферного редагування спочатку порівнювалися дві доступні структури з добре вивченими APCзами інших видів (рис.8).

Після ідентифікації важливих залишків (тих, що відіграють роль у фіксації A76), на сервері HADDOCK виконувався гнучкий докінг молекули тРНК.

Для релаксації об'єкту проводилась 100 нс динаміка, а потім використовувався режим керованої МД для стабілізації комплексів протягом першого періоду симуляції (30 нс), а також при фіксації пуринової основи A76 у сайті із дистанційними обмеженнями за допомогою моделі швидкості СОМ

(Center of Mass), щоб стримувати невігідний рух кінцевого 3'-ССА тРНК. Обидві траєкторії Nva- та Pe-tRNA^{Leu} із LeuRS^{Ph} були проаналізовані, і найбільш стабільні (з точки зору частоти коливань протягом МД) структури були згруповані у 10 кластерів, які потім використовувалися далі в оцінці механізму пост-трансферного редагування.

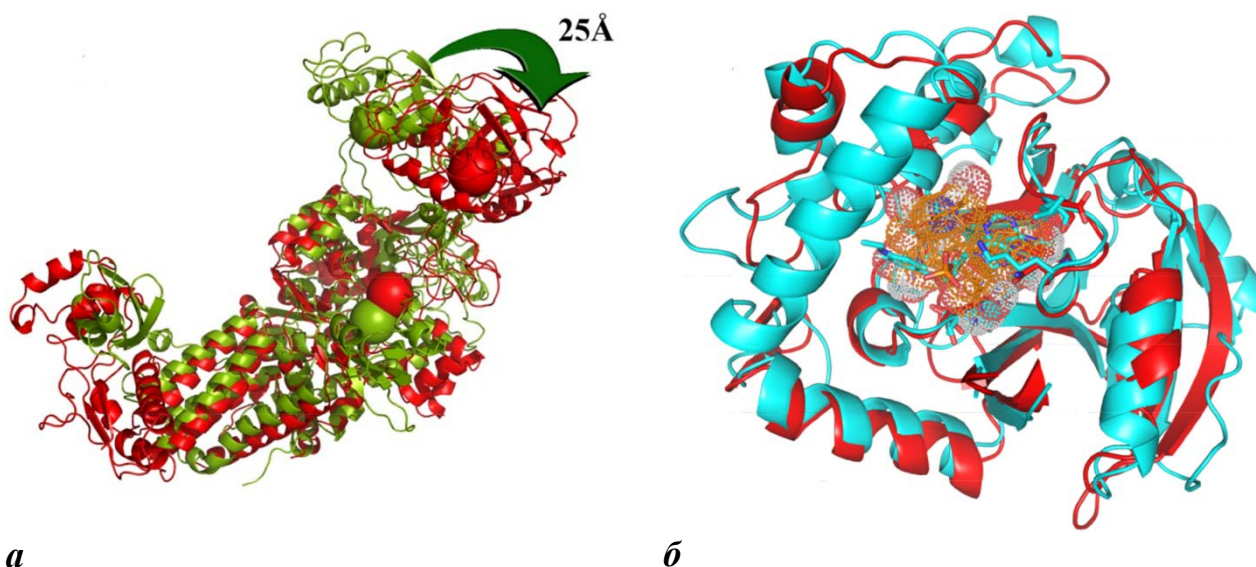


Рис. 8. На зображенні показано вирівнювання двох гомологічних структур LeuRS. Структури LeuRS із *P.horikoshii* (червоний) проти LeuRS із *T.thermophilus* (зелений) (а). Сайти аміноацилювання та редагування представлені сферами відповідного кольору. Порівняння поверхні сайту зв'язування редагувальних доменів LeuRS із *P.horikoshii* (червоним) та *C.albicans* (блакитним) із закристилізованим лігандом (блакитна стрижнева модель) (б)

Для вивчення сили зв'язування пост-трансферних субстратів з редагувальним сайтом було проаналізовано кількість міжмолекулярних водневих зв'язків та показано, що середня кількість водневих зв'язків для Nva-A76 це 7,3, а для Pe-A76 - 5,1. Найбільш стійкі зв'язки утворювалися із Met323, Asp332 та Lys398. Було показано, що кількість води поблизу Nva-A76 протягом 5 нс була в 10 разів вище, ніж у аналогічній системі біля Pe-A76. Додатково комплекс аміноацил-тРНК (Nva-A76 / Pe-A76) перевірявся щодо відповідної геометрії між киснем води та карбоксильною групою і стабільністю цієї геометрії (рис. 9).

Ще одна необхідна умова вибору молекули води – активація оточуючими факторами (наприклад, Asp332, Thr234 або 3'-ОН A76) та стабільність молекули води під час МД, щоб забезпечити достатній час для протікання реакції. У випадку з Nva-A76 молекула води W1, яка займала необхідну позицію для атаки, утворила водневий зв'язок з найближчою молекулою води W2 (допоміжною, або асистуючою молекулою води), яку можна було активувати консервативним Thr234 (рис. 9).

Отже, результати наших досліджень показали, що Pe-A76 займає подібне місце та орієнтацію, що й Nva-A76, але розгалужений боковий ланцюг

перешкоджає наближенню молекул води, і тому реакція гідролізу значно затримується. В Пе-А76 метильна група експонується із кишені, що створює стеричну перешкоду для розчинника. Жодна з молекул води поблизу Пе-А76 не утворювала взаємодії з білками або іншими молекулами води.

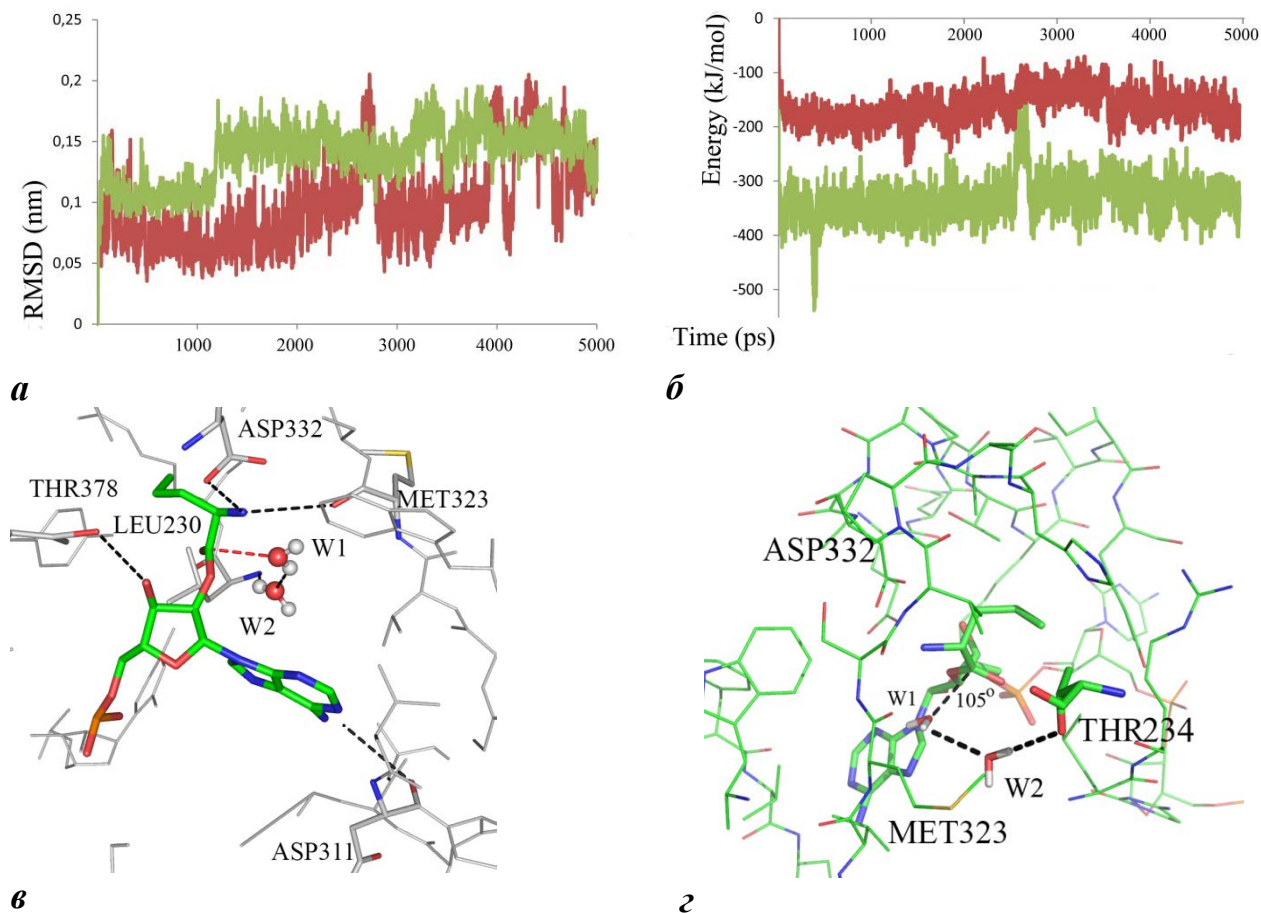


Рис. 9. RMSD структури Nva-A76 (а) та енергії електростатичної взаємодії із білком, LeuRSPH (б). Зеленим кольором позначено графіки Nva-A76, червоним - Пе-А76. Запропонований механізм нуклеофільної атаки молекулою води (W1) на карбонільний вуглець Nva-A76 та утворення водневих зв'язків із навколишніми амінокислотами (в) і демонстрація активації води через Thr234 з іншого ракурсу (г)

Таким чином, на основі отриманих результатів можна стверджувати, що, в цілому, механізм редагування помилкових субстратів в активному сайті редагувального домену відбувається схожим чином у LeuRS прокариотичного та архейного типу.

При цьому передумовою процесу гідролізу є взаємовигідна геометрія субстрату, активного сайту та двох молекул води. Ці дані досить сильно відрізняються від багатьох попередніх досліджень, адже наявність другої, асистуючої, молекули води може значно знизити енергетичний бар'єр реакції. Цікаво, що у випадку LeuRSPH молекула атакуючої води підходить до субстрату з боку Met323, тоді як у випадку LeuRSt молекула води підходить з протилежної сторони – з боку Asp344 (Ala329 у LeuRSPH). Це, в свою чергу, обумовлено

деякими відмінностями в первинній структурі обох ферментів у ділянці, що відповідає структурі редагувального сайту.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі методами комп'ютерного моделювання молекулярної динаміки виявлені структурні особливості та молекулярні механізми, які лежать в основі еволюційного пристосування лейцил-тРНК синтетази до корегування помилок синтезу аміноациладенілату і аміноацилювання тРНК. Продемонстровано наявність структурних елементів та проаналізовано їх функціональну роль у забезпеченні селективності APCаз I класу на прикладі LeuRS проти ряду субстратів.

1. На основі аналізу баз даних кристалічних структур та вирівнювання послідовностей було створено моделі білково-нуклеїнових комплексів *LeuRStt* та *LeuRSPh*, придатні для молекулярної динаміки.

2. За допомогою молекулярного докінгу субстратів пре-трансферного та пост-трансферного редагування в різні сайти зв'язування досліджуваних LeuRS отримано структури відповідних комплексів. В результаті порівняння конформацій та показників докінгу визначено ймовірність та ефективність зв'язування лігандів та відібрано їхні найкращі положення для дослідження методами молекулярної динаміки.

3. Підібрано найбільш коректну процедуру призначення зарядів для субстратів за допомогою методу RESP, обґрунтоване її використання та проведено молекулярну динаміку для отримання інформації про взаємодію всіх типів лігандів з амінокислотними залишками редагувальних сайтів. Створено повноцінні та конформаційно стабільні моделі ензимів із аміноацильованими тРНК для проведення комп'ютерних досліджень різного ступеня складності, в тому числі вивчення мутацій та каталітичних реакцій

4. В результаті дослідження процесу аміноацилювання методами молекулярної динаміки було показано, що ймовірність утворення аміноациладенілату з подібних до лейцину амінокислот залежить від їх розміру та рухливості відносно молекули АМР у аміноацилювальному сайті зв'язування. В свою чергу, механізм захисту утворених аміноациладенілатів від пре-трансферного редагування визначається положенням ключових амінокислотних залишків аміноацилювального (Asp80, Tyr43) відносно площини ангідридного зв'язку. кількістю обертових зв'язків та розгалуженістю амінокислотної частини аміноациладенілату.

5. Продемонстровано подібність структурних елементів комплексів помилково синтезованих пост-трансферних субстратів в редагувальних сайтах CP1 доменів та виявлені відмінності механізмів гідролізу для LeuRS

прокаріотичного і архейного походження. Визначено роль залишків Asp347, Thr247, Thr248 (LeuRSTt) або Asp332, Leu230 та Glu394 (LeuRSPH) у зв'язуванні субстрату та та забезпеченні вигідної геометрії для нуклеофільної атаки. Визначено активуючу роль 3'-ОН' групи рибози A76 у процесі гідролізу під час пост-трансферного редагування. Аналіз взаємної геометрії субстрату, оточуючих залишків та молекул води протягом молекулярної динаміки дозволив охарактеризувати механізм гідролізу Nva-A76 в результаті атаки естерного зв'язку молекулою води. Показано, що наявність атакуючої та асистуючої молекул води, які координуються амінокислотами сайту, є обов'язковою і для LeuRSTt, і для LeuRSPH. При цьому відрізняються ці процеси у LeuRSTt і LeuRSPH просторовою орієнтацією молекул води.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Rayevsky AV**, Tukalo MA. Molecular docking and molecular dynamics simulation studies on Thermus thermophilus leucyl-tRNA synthetase complexed with different amino acids and pre-transfer editing substrates. Biopolymers and Cell. – 2016;32(1):61-69. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментів, написання статті)*
2. **Rayevsky AV**, Tukalo MA. Computational approaches for parameterization of aminoacyl-tRNA synthetase substrates. Biopolymers and Cell. 2018;34(3):239–247. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментів, написання статті)*
3. **Rayevsky AV**, Sharifi M, Tukalo M. A molecular dynamics simulation study of amino acid selectivity of LeuRS editing domain from Thermus thermophilus. J Mol Graph Model. 2018;84:74-81. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментів, написання статті)*
4. **Rayevsky AV**, Sharifi M, Tukalo MA. Molecular modeling and molecular dynamics simulation study of archaeal leucyl-tRNA synthetase in complex with different mischarged tRNA in editing conformation. J Mol Graph Model. 2017;76:289-295. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментів, написання статті)*
5. Boyarshin KS, Priss AE, **Rayevskiy AV**, Ilchenko MM, Dubey IY, Kriklivyi IA, Yaremchuk AD, Tukalo MA. 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. 2017;35(3):669-682. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка експериментів, написання статті)*

Тезиси:

6. **Raevskiy A**, Tukalo M. Molecular dynamics simulation study of Thermus thermophilus leucyl-tRNA synthetase with it pre- and post-transfer editing substrates.

4th International symposium “Methods and applications of computational chemistry”, 2011, 28 June-2 July, Lviv, Ukraine. P. 128.

7. Tukalo M, Kovalenko O, Boyarshin K, **Raevskiy A**, Yaremchuk A, Krikliiviy I, Cusack S. The methods of structural and computational biology in study of fidelity of gen expansion. VIII Parnas Conference, 27-31 August, Warsaw, Poland. Acta Biochemica Polonica, -2011, -V. 58. Supplement 1/2011, Abstract L3.1.

8. **Раєвський ОВ**, Тукало МА. Використання методів молекулярної динаміки для вивчення особливостей взаємодії субстратів пре- та пост-трансферного редагування із активними центрами архейної лейцил-тРНК синтетази. Матеріали Х міжнародної наукової конференції студентів та молодих науковців, 2012, 19-23 березня, Київ, Україна. С. 263.

9. Tukalo M, Yaremchuk A, Boyarshyn K, Kovalenko O, **Raevskiy A**, Krikliiviy I, Gudzera O, Priss A, Il'chenko M, Dubey I. tRNA-assisted mechanism of post-transfer editing by class I and class II aminoacyl-tRNA synthetases. 9th International symposium on aminoacyl-tRNA synthetases. 2013, 6-11 October, Hakone, Japan. P. 26.

10. Tukalo M, Yaremchuk A, Boyarshyn K, Kovalenko O, **Raevskiy A**, Krikliiviy I, Gudzera O, Priss A, Il'chenko M, Dubey I. tRNA-assisted editing mechanism in translation quality control. 38th FEBS Congress, 2013, 6-11 July, St.Peterburg, Russia. P.038.

11. Boyarshyn K, Priss A, **Raevskiy A**, Krikliiviy I, Kovalenko O, Il'chenko N, Dubey I, Yaremchuk A, Tukalo M. tRNA ensures amino acid specificity of enterococcal prolyl-tRNA synthetase on the steps of editing. FEBS 13th Young Scientists Forum, 2013, 3 – 6 July, St.Peterburg, Russia. P.43.

12. Бояршин КС, Присс АЕ, **Раєвський АВ**, Крикливий ІА, Коваленко ОП, Ильченко НН, Дубей ИЯ, Яремчук АД, Тукало МА. тРНК забезпечує точність синтезу пролил-тРНК^{Pro} на двох етапах редагування продукту. XI Український біохімічний конгрес, 2014, 6-10 жовтня, Київ, Україна. P. 16.

13. Бояршин КС, Присс АЕ, **Раєвський АВ**, Крикливий ІА, Ильченко НН, Дубей ИЯ, Яремчук АД, Тукало МА. Редактирование пролил-тРНК синтетазой бактериального типа продуктов ошибочного узнавания аланина. 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых "Биология-наука XXI века", 2015, 20-24 апреля 2015, Пущино, Россия. С. 220.

14. Tukalo M, Kovalenko O, Rybak M, Gudzera O, **Raevskiy A**, Il'chenko M, Dubey I, Krikliiviy I, Yaremchuk G. Quality control of nonproteinogenic aminoacids: tRNA-dependent mechanisms of the errors editing. IX International meeting “From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies”, 2016, 19–22 September, Lviv, Ukraine. P. 320.

15. Rybak M, Kovalenko O, **Raevsky A**, Tukalo M. The methabolic pathway of D-Tyr and editing of D-Tyr misamunoacylated substrates in *Thermus thermophilus*. 42nd FEBS congres from molecules to cells and back, 2017, 10-14 September, Jerusalem, Israel. P. 293.

16. Rybak MYu, Kovalenko OP, **Rayevsky AV**, Ilchenko MM, Tukalo M.A. D-aminoacyl-tRNA-deacylase: an essential enzyme for protein quality control during

translation initiation. EMBO Workshop: «Enzyme, biocatalysis and chemical biology: The new frontiers», 2018, 09-12 September, Pavia, Italy. – P. 61.

17. Tukalo M, Kovalenko O, Rybak M, **Rayevskiy A**, Il'chenko M, Gudzera O, Kriklivyi I, Yaremchuk G, Dubey I. tRNA-dependent mechanism of the errors editing in translation quality control. 27th tRNA Conference, 2018, 23-28 September, Strasbourg, France. P. 190.

18. Ilchenko MM, Rybak MY, **Rayevsky AV**, Kovalenko OP, Dubey IY, Tukalo MA. Substrate-assisted mechanism of catalytic hydrolysis of misaminoacylated tRNA required for protein synthesis fidelity. *Biochem J.* 2019 Feb 28;476(4):719-732.

АНОТАЦІЯ

Раєвський О.В. Молекулярна динаміка комплексів лейцил-тРНК-синтетаз бактеріального та архейного походження із помилково синтезованими продуктами реакції аміноацилювання – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2019.

Дисертація присвячена вивченню механізмів редагування аміноацил-тРНК синтетазами помилково синтезованих продуктів реакції аміноацилювання. У результаті дослідження структурних основ селективності амінокислот у аміноацилювальному сайті LeuRS із *T. thermophilus* ми показали картину зв'язування субстратів аміноацилювання, амінокислот та АМР, що обумовлюють ймовірність утворення аміноациладенілатів. Було показано, що екранування бічним радикалом Tyr43 є механізмом захисту вже утворених аміноациладенілатів (пре-трансферних субстратів) від гідролізу в процесі пре-трансферного редагування помилково синтезованих продуктів.

Для моделювання процесу пост-трансферного редагування у CP1-домені LeuRS було підібрано та перевірено алгоритм R.E.D.III обрахунку точкових зарядів при генеруванні топології для структур аміноацил-тРНК. Протокол підготовки, запуску та аналізу результатів молекулярної динаміки було відпрацьовано, спираючись на результати біохімічних експериментів для систем LeuRS з *T. thermophilus* (I клас синтетаз) та ProRS з *E. faecalis* (II клас синтетаз). В результаті аналіз траєкторій бактеріальної та архейної LeuRS підтвердив, що субстрат Nva-A76 зв'язується міцніше, ніж Ile-A76. З іншого боку, наша симуляція показала що причиною різниці в швидкості гідролізу для Nva-tRNA^{Leu} та Ile-tRNA^{Leu} у CP1-доменах LeuRS *T. thermophilus* та *P. horikoshii* є бічний ланцюг Ile-A76, що стерично перешкоджає наближенню атакуючої молекули води і призводить до значного зниження швидкості гідролізу. Молекулярна динаміка мутантної форми LeuRS^{Tt} із критичною для реакції редагування заміною Asp347Ala продемонструвала важливість 3'-ОН групи A76 tRNA^{Leu} та ОН-групи

бічного ланцюга Thr247, що відрізняється від результатів опублікованих розрахунків. На основі отриманих даних нами також запропонований механізм гідролізу Nva-A76 в LeuRSP_h, схожий на представлений механізм для LeuRST_t, із різницею у просторовій орієнтації молекул води.

Ключові слова: лейцил-тРНК синтетаза, молекулярне моделювання та докінг *in silico*, специфічність, механізми редагування

АННОТАЦІЯ

Раевский А.В. Молекулярная динамика комплексов лейцил-тРНК-синтетаз бактериального и архейного происхождения с ошибочно синтезированными продуктами реакции аминокислотирования. - Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 - молекулярная биология. - Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2019.

Диссертация посвящена изучению механизмов изменения аминокислот-тРНК синтетазами ошибочно синтезированных продуктов реакции аминокислотирования. В результате исследования структурных основ селективности аминокислот в аминокислотном сайте LeuRS с *T.thermophilus* мы показали картину связывания субстратов аминокислотирования, аминокислот и АМР, что обуславливает вероятность образования аминокислотаденилатов. Было показано, что экранирование боковым радикалом Tyr43 является механизмом защиты уже образованных аминокислотаденилатов (пре-трансферных субстратов) от гидролиза в процессе пре-трансферного редактирования ошибочно синтезированных продуктов.

Для моделирования процесса пост-трансферного редактирования в CP1-домене LeuRS был выбран и проверен алгоритм R.E.D.III расчета точечных зарядов при генерировании топологии для структур аминокислот-тРНК. Протокол подготовки, запуска и анализа результатов молекулярной динамики было отработано, опираясь на результаты биохимических экспериментов для систем LeuRS из *T.thermophilus* (I класс синтетаз) и ProRS из *E.faecalis* (II класс синтетаз). В результате анализ траекторий бактериальной и архейной LeuRS подтвердил, что субстрат Nva-A76 связывается прочнее, чем Ile-A76. С другой стороны, наша симуляция показала, что причиной разницы в скорости гидролиза для Nva-tRNA^{Leu} и Ile-tRNA^{Leu} в CP1-доменах LeuRS *T.thermophilus* и *P.horikoshii* является боковая цепь Ile-A76, что стерически препятствует приближению атакующей молекулы воды и приводит к значительному снижению скорости гидролиза. Молекулярная динамика мутантной формы LeuRST_t с критической для реакции редактирования заменой Asp347Ala продемонстрировала важность 3'-ОН группы A76 tRNA^{Leu} и ОН-группы боковой цепи Thr247, что отличается от результатов опубликованных расчетов. На основе полученных результатов нами

также предложен механизм гидролиза Nva-A76 в LeuRSP_h, похожий на представленный механизм для LeuRSt_t, с разницей в пространственной ориентации молекул воды.

Ключевые слова: лейцил-тРНК синтетазы, молекулярное моделирование и докинг *in silico*, специфичность, механизмы редактирования

SUMMARY

Rayevsky O.V. "Molecular dynamics of bacterial and archaeal Leucyl-tRNA synthetase complexes with erroneously synthesized products of aminoacylation" - Manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Biological Sciences, specialty 03.00.03 - Molecular Biology. - Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv, 2019.

The thesis is devoted to the study of the mechanisms provided by aminoacyl-tRNA synthetases to edit misactivated tRNA. We engaged molecular docking and molecular dynamics techniques to study the structural basis of amino acid selectivity by aminoacylation site of LeuRS from *T.thermophilus* and to describe the binding of pre-transfer substrates. The simulation results showed some differences in the behavior of a number of aminoacylation substrates, amino acids and AMP, which determine the probability of aminoacyladenylate formation. In particular, Tyr43 radical's shielding could be a mechanism to protect already formed aminoacyladenylates from hydrolysis during pre-transfer editing of erroneously synthesized products.

To simulate the post-transfer editing process in CP1 domain of the LeuRS, the R.E.D.III algorithm of partial charges fitting for aminoacyl-tRNA structures was generated and validated. The protocol of the preparation, run and the analysis of molecular dynamics results was refined based on the results of biochemical experiments for LeuRS systems from *T.thermophilus* (class I synthetase) and ProRS from *E.faecalis* (class II synthetase). The substrate's ability to be bound with the post-transfer editing site was estimated by comparing the interaction energies of the ligand with the amino acids of the site and estimation of the number of intermolecular hydrogen bonds. In the case of R.E.D. III algorithm application the conformation and water accessibility of the ester bond in leucyl-tRNA fragment significantly depends on the residue in 252 position of CP1 domain. In the WT protein the molecule of leucyl-tRNA is weakly interact with Asp347 and rarely with Thr247, a side chain of leucine is exposure out of the binding site. At the same time T252A mutation creates an additional space, which is sufficient for location of leucine and appropriate orientation of the ester's bond plane. H-bond interactions with Thr247 and Thr248 increase the probability of nucleophilic attack on the carbonyl carbon of the ligand due to stabilization of the geometry and pulling of the electron cloud density. At the same

time Asp347 forms a strong interaction with amino group of leucyl-tRNA with decrease in the number of degrees of freedom.

Similar study was conducted for Ala-tRNA^{Pro} from bacterial ProRS *E.faecalis* to confirm the quality of the simulation results. To run the simulation, a ProRS structure from *E.faecalis* in complex with tRNA in the editing conformation was modeled, which is significantly different from the existing crystal structures. The trajectory analysis provided an information to determine the pre-reaction coordinates in the editing site. As a result, the 2'-OH group of terminal adenosine (76) of Ala-tRNA^{Pro} has been identified as the most important functional element of this mechanism. The group forms a hydrogen bond with the carbonyl group of the alanine residue, which greatly facilitates the hydrolysis reaction in the presence of two water molecules and a strong hydrogen molecule network between all participants in the reaction. Thus, we demonstrated the mechanism of the post-transfer editing in ProRS and the differences in this process between aminoacyl-tRNA synthetases of class I and II.

A constrained and free molecular dynamics technique have been combined to determine the factor that causes faster hydrolysis of Nva-tRNA^{Leu} compared to Ile-tRNA^{Leu} in the CP1 domain of bacterial and archaeal LeuRSs. For this purpose, four models were constructed and relaxed via MD simulations of 100 ns. The analysis of MD trajectories showed that Nva-A76 substrate binds more strongly than Ile-A76 and the number of H-bonds and its stability, including Thr247 and Asp347 interactions, is significantly different. On the other hand, our simulation showed another possible cause of the difference in the rate of hydrolysis for Nva- tRNA^{Leu} and Ile-tRNA^{Leu} in the CP1 domains of LeuRS *T.thermophilus* and *P.horikoshii*. The simulation showed that the branched Ile-A76 side chain sterically hinders the approach of the attacking water molecules, resulting in a significant reduction in the rate of hydrolysis.

The molecular dynamics of the LeuRSTt mutant form Asp347Ala, which is critical for the inactivation of the editing function, revealed a number of structural differences in the binding of Nva- and Ile-tRNA^{Leu} in the active site of the editing domain, which may affect the selectivity during substrate hydrolysis. In our model, there are hydrogen bonds between the norvaline's carbonyl group and 3'-OH group of the A76 tRNA^{Leu} and side chain OH group of Thr247. Thus, the obtained results indicated that new quantum-mechanical calculations of the mechanism of post-transferring LeuRSTt editing in ensemble of two water molecules are needed to extend our knowledgebase. Based on the data obtained, we also suggested a mechanism of hydrolysis of Nva-A76 in LeuRSP_h, which is similar to the mechanism presented for LeuRSTt, with the only difference in the spatial orientation of the water molecules.

Key words: leucyl-tRNA synthetase, molecular modeling and *in silico* docking, specificity, mechanisms of editing