

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

**ДИСЕРТАЦІЯ**

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

03.00.03 – молекулярна біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

\_\_\_\_\_ О.В. Раєвський

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, академік НАН  
України М.А. Тукало

Київ – 2019

## АНОТАЦІЯ

**Раєвського 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 Національної Академії Наук України, Київ, 2019.

Серед багатьох аміноацил-тРНК синтетаз, що приймають участь в процесі аміноацилювання, в окрему групу можна віднести валіл-, ізолейцин- та лейцил-тРНК синтетаз (LeuRS). При цьому найбільш складною і унікальною, через специфіку сайту, організацію доменів та особливості його субстрату є саме LeuRS. Незважаючи на значну кількість проведених досліджень, особливо щодо механізму функціонування редаугвального CP1 домену, процес відбору амінокислот під час аміноацилювання залишається невивченим. Щоб вивчити структурні основи селективності амінокислот у аміноацилювальному сайті LeuRS із *Thermus thermophilus* і показати картину зв'язування пре-трансферних субстратів ми використовували молекулярні докінг та динаміку. Такий підхід дозволяє виявити і візуалізувати причини відсіву неправильних субстратів за формою, розміром і гнучкістю радикалів. Базуючись на біохімічних результатах, першочергово було проаналізовано поведінку ряду амінокислот в аміноацилювальному сайті. Так, дані по моделюванню амінокислот із AMP у сайті показали, що відмінності в жорсткого каркасу ізолейцину та його великій площі поверхні призводять до більш низької електростатичної взаємодії із активним сайтом ферменту порівняно із норваліном та лейцином.

Ці та інші амінокислоти були обрані саме через можливість побудувати кореляцію між конфірмаційними зсувами і експериментальними результатами. Експериментальні та наші дані показали, що норвалін, а також

лейцин є значно вірогіднішими субстратами в реакції активації порівняно із ізoleyцином при утворенні аміноациладенілатів. Подальше вивчення аміноациладенілатів показало, що зниження ступеня активації деяких амінокислот може бути спричинене рядом причин: надмірною гнучкістю, розміром або структурою та швидким гідролізом проміжного субстрату завдяки нуклеофільній атаці молекул води. Це досить чітко пояснює попередній відсів валіну та цистеїну і визначає механізм захисту різних аміноациладенілатів від гідролізу за рахунок екранування площиною радикалу Tyr43. В свою чергу, було показано, що Leu-AD та Nva-AD легко гідролізуються водою на відміну від інших пре-трансферних субстратів, наприклад, гомоцистеїніл- та норлейциладенілатів. Пройшовши перше «сито» у аміноацилювальному сайті, молекули амінокислот переносяться на тРНК, після чого вони потрапляють в редагувальний домен для повторної перевірки.

Нещодавно було показано, що саме проти норваліну сформувалась пост-трансферна редагувальна функція LeuRS. Таким чином, це еволюційно обумовлена селективність LeuRS, яка є єдиною відомою синтетазою, у якій пост-трансферне редагування спрямоване проти непротеїногенної амінокислоти. Структурна передумова пост-трансферної селективності LeuRS досі залишається невивченою. Тому в даному дослідженні ми використовували методи МД для визначення того фактору, який зумовлює швидший гідроліз Nva-tRNA<sup>Leu</sup> порівняно з Ile-tRNA<sup>Leu</sup> у CP1 домені бактеріальної та архейної LeuRS з *T.thermophilus* та *P.horikoshii*.

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). 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.

В той же час 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 топологій, 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<sup>Leu</sup> ані в білку дикого, ані мутантного білків. Конформація Leu-tRNA<sup>Leu</sup> залишалася майже незмінною протягом МД незалежно від наявності мутації, але кількість молекул води біля карбонільного вуглецю лейцину зросла у випадку мутантного домену. 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<sup>Pro</sup> 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<sup>Pro</sup> в редагувальному сайті ProRS було передбачено механізм редагування. Аналіз траекторій, у свою чергу дав матеріал, достатній для визначення предреакційних координат в редагувальному сайті. В результаті, найважливішим функціональним елементом цього механізму була визначена 2'-ОН-група кінцевого аденозину (76) Ala-tRNA<sup>Pro</sup>, що утворює водневий зв'язок із карбонільною групою залишку аланіну, що сильно полегшує реакцію гідролізу при наявності двох молекул води і міцної водневої сітки між всіма учасниками реакції. Таким чином було продемонстровано механізм посп-трансферного редагування в ProRS і відмінностей у цьому процесі між аміноацил-тРНК синтетазами I та II класу.

Після цього було побудовано по дві моделі для LeuRS із *T.thermophilus*, проведено та проаналізовано молекулярну динаміку комплексів, за результатами якої показано, що субстрат Nva-A76 зв'язується міцніше, ніж Ile-A76. З іншого боку, наша симуляція показала ще одну можливу причину різниці в швидкості гідролізу для Nva-tRNA<sup>Leu</sup> та Ile-tRNA<sup>Leu</sup> у CP1 домені LeuRS. Моделювання МД показує, що розгалужений бічний ланцюг Ile-A76 стерично перешкоджає наближенню атакуючої молекули води, що призводить до значного зниження швидкості гідролізу.

Молекулярна динаміка мутантної форми LeuRS<sup>Tt</sup> із критичною для реакції редагування заміною Asp347Ala, дозволила виявити цілу низку структурних відмінностей у зв'язуванні Nva- та Ile-tRNA<sup>Leu</sup> 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<sup>Leu</sup> 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. Однак слід звернути увагу на

важливу відмінність ролі Thr248 у механізмі, представленому японською групою Nagiwa et al., коли під час процесу гідролізу Val-tRNA<sup>Leu</sup>, бічна OH-група Thr248 зв'язується із 3'-ОН групою тРНК, а A76 і відіграє важливу роль ініціатора реакції. У той же час, Mursinna та його колеги показали, що пост-трансферна редагувальна активність мутанта Thr248Ala у LeuRS падає лише в 1,5 рази по відношенню до активності ферменту дикого типу.

І накінець, наші результати підтримують гіпотезу про те, що час існування зв'язків між OH бічного ланцюга Thr248 і 3'-ОН субстрату не змінюється для обох типів субстратів, які гідролізуються з різною швидкістю. У нашій моделі 3'-ОН група A76 tRNA<sup>Leu</sup> та OH-група бічного ланцюга Thr247 утворюють водневі зв'язки із карбонільною групою норваліну. Таким чином, це вказує на те, що необхідні нові квантово-механічні розрахунки механізму пост-трансферного редагування LeuRS<sup>Leu</sup> з залученням двох молекул води, які б дозволили уникнути приведених протиріч.

Редагувальний домен може бути еволюційним доповненням до аміноацилювального каталітичного домену IleRS, ValRS та LeuRS. Функціональні аспекти механізму редагування у прокариотичних APCаз класу 1A вже досить широко вивчені, а для LeuRS<sup>Leu</sup> вже навіть запропоновано механізм гідролізу неправильно ацильованої тРНК. Проте еукаріотичні та архейні APCази цього підкласу, що мають виский ступінь гомології, не вивчаються в тій же мірі. Тому, для порівняння механізмів функціонування редагувальних доменів, була створена модель LeuRS із *P.horikoshii* в комплексі із tRNA<sup>Leu</sup>, де акцепторний стовбур тРНК був напрямлений у сайт редагування. Аналіз структури LeuRS<sup>Ph</sup> показав доменну організацію спільну із групою LeuRS, ValRS та IleRS із *T.thermophilus*. Більш того, CP1 домен складається із аналогічних структурних елементів і в тій же послідовності, що і ті, що виявлені в LeuRS із *C.albicans* і *H.sapiens*. Отже, треба відзначити, що сайт редагування LeuRS із *P.horikoshii* має багато спільного із ортологічними доменами бактеріальних LeuRS. На підставі цих висновків були отримані

конформацій субстратів пост-трансферного редагування, Nva-76 та Ile-76, у сайті редагування LeuRSP $h$ . Незважаючи на різницю у взаємодіях між tRNA<sup>Leu</sup> та ферментами із *T.thermophilus* та *P.horikoshii*, зв'язування пост-трансферного субстрату є досить подібним. Як і у випадку бактеріальної LeuRST $t$ , аміногрупа норваліну утворює Н-зв'язки із Asp332 (тотжний до Asp347 в LeuRST $t$ ). Наступним важливим фіксатором субстрату в LeuRST $t$  виступають Thr247 і Thr248, консервативні елементи багатих треоніном мотивів ферментів бактерій. В той же час в архейних LeuRS Thr248 замінено на Leu230.

Щоб дослідити можливий механізм реакції пост-трансферного редагування у LeuRSP $h$ , молекули води були локалізовані поблизу карбонільної групи амінокислоти, яка мала бути гідролізована. За позицією атомів водню та кутом наближення до карбонільного вуглецю було обрано дві молекули, що відповідали усім критеріям відбору. Одна із них (W1), молекула атакуючої води, здатна здійснити атаку на електрофільну карбонільну групу для гідролізу ефірного зв'язку. Молекула атакуючої води підходить до субстрату із протилежної сторони, ніж у випадку LeuRST $t$ . Ця молекула води формує водневі зв'язки з другою молекулою (W2), утворюючи містки із Н-зв'язок із залишком Thr234. Друга молекула води може теж брати участь у процесі та ще більше полегшити гідроліз. Участь двох молекул води у гідролізі помилкового продукту було запропоновано нами також для механізму пост-трансферного редагування ProRS. Механізм редагування у LeuRSP $h$  відрізняється від подібного у LeuRST $t$ , редагувальний сайт якої може працювати із залученням нового гібридного рибозим/білкового каталізатора для виключення помилково активованих tRNA<sup>Leu</sup>. У моделі для LeuRST $t$  було запропоновано, що 3'-ОН-груп кінцевого A76 tRNA<sup>Leu</sup> активує молекули води, а отже, приймає участь у розщеплення ефірного зв'язку. У той же час, у моделі LeuRSP $h$  3'-ОН-група кінцевого A76 знаходиться на відстані більше 3.5 Å від атакуючої молекули води. Тобто, у випадку LeuRSP $h$  поки що не показано, що

3'-ОН-група кінцевого A76-tRNA<sup>Leu</sup> приймає безпосередню участь у реакції гідролізу.

Отже, результати МД показали, що пост-трансферний субстрат Nva-A76 зв'язується сильніше, за Ile-A76. Запропонований вище механізм гідролізу відповідає ситуації із редагуванням Nva-A76, яка вважається головним (спорідненим) пост-трансферним субстратом для LeuRS. В той же час, Ile-A76 зв'язується менш сильно із редагувальним сайтом і менш відкрита для молекул води, що робить цей субстрат менш придатним для гідролізу. Загалом, ці результати корелюють із біохімічними даними по бактеріальній LeuRS із *E.coli*, коли швидкість гідролізу аміноацил-тРНК, вимірювана методом вимірювання одного оборота реакції (single-turnover) для Nva-tRNA<sup>Leu</sup>, на порядок перевищувала швидкість для Ile-tRNA<sup>Leu</sup>.

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

### Список публікацій за темою дисертаційної роботи:

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*)
6. **Raevskiy A**, Tukalo M. Molecular dynamics simulation study of *Thermus thermophilus* leucyl-tRNA synthetase with its 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, Kriklivyi I, Cusack S. The methods of structural and computational biology in study of fidelity of gene 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, **Раевский АВ**, Крикливый ИА, Коваленко ОП, Ильченко НН, Дубей ИЯ, Яремчук АД, Тукало МА. тРНК забезпечує точність синтезу пролил-тРНК<sup>Про</sup> на двох етапах редагування продукту. XI Український біохімічний конгрес, 2014, 6-10 жовтня, Київ, Україна. Р. 16.

13. Бояршин КС, Присс АЕ, **Раевский АВ**, Крикливый ИА, 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 misaminoacylated substrates in *Thermus thermophilus*. 42nd FEBS congress 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.

## 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.

Among all aminoacyl-tRNA synthetases involved in the aminoacylation process, a triad of valyl-, isoleucine-, and leucyl-tRNA synthetases (LeuRS) forms a separate group. At the same time, LeuRS is the most complex and unique due to the specifics of the aminoacylation site, the domains organization and physicochemical features of the substrate. Despite the considerable amount of research, especially regarding the mechanism of functioning of the editing CP1 domain, the process of specific amino acid selection remains unexplored. We utilized molecular docking and dynamics to study the structural basis of amino acid selectivity in the LeuRS aminoacylation site of *Thermus thermophilus* and to demonstrate the binding of pre-transfer substrates. This approach allows us to identify and visualize the reasons of irradiation of non-cognate substrates by the shape, size and flexibility of the side chain radicals. Based on the biochemical results we analyzed the behavior of a number of amino acids in the aminoacylation site. Thus, our modeling data showed that the differences in rigid isoleucine scaffolds and its large surface area lead to a lower electrostatic interaction with the active site of the enzyme compared to norvaline and leucine.

These and other amino acids were chosen because of the ability to make a correlation between the conformational changes and experimental results. Both experimental and our data have shown that norvaline as well as leucine are significantly more likely substrates of the activation reaction than isoleucine. Further study of aminoacyladenylates showed that the decrease in the degree of activation of some amino acids can be caused by a number of reasons: excessive flexibility,

size or structure, and rapid hydrolysis of the intermediate substrate due to the nucleophilic attack of water molecules. This clearly explains the previous elimination of valine and cysteine and defines the mechanism of protection of various aminoacyladenylates from hydrolysis by shielding with the Tyr43 radical plane. In turn, Leu-AD and Nva-AD have been shown to be easily hydrolyzed by water unlike other pre-transfer substrates, for example, homocysteine and norleucyladenylates. After passing the first "sieve" at the aminoacylating site, the amino acid molecules are transferred to the tRNAs, after which they enter the editing domain for the re-verification.

Recently, it was revealed that the post-transfer editing function of LeuRS was formed against norvaline. Thus, it is an evolutionarily driven selectivity of LeuRS, which is the only known synthetase, which post-transfer editing activity is directed against a non-proteinogenic amino acid. The structural reasons of the post-transfer selectivity of LeuRS remains unexplored. Therefore, in this study, we used MD methods to determine the factor that causes faster hydrolysis of Nva-tRNA<sup>Leu</sup> compared to Ile-tRNA<sup>Leu</sup> in the CP1 domain of bacterial and archaeal LeuRS from *T.thermophilus* and *P.horikoshii*. To simulate the post-transfer editing process in CP1 of the LeuRS domain, the R.E.D.III algorithm for calculating point charges of aminoacyl-tRNA structures was used 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.

For example, the method of simple concatenation of topologies for amino acid and nucleotide A76 turned out to be somehow unrepresentative and inappropriate for the mechanism study, particularly with respect to the absolutely similar stability either of the substrates and inability to interpret our in-home and already published biochemical data. Incorrect charge distribution, the model prepared with a topology combination, causes an increased turnover of the amino acid radical independently of residue in 252 position and loss of interaction with Thr247. Application of the combined topology of N-Leucine with a non-terminal adenosine didn't demonstrate any significant differences in the binding mode of Leu-tRNA<sup>leu</sup> in either wild-type or mutant proteins. In general, Leu-tRNA<sup>leu</sup> conformation stayed the same during the MD regardless of mutation, but the number of water molecules near the carbonyl carbon of leucine increased in the case of T252A simulation. The interaction of Leu-tRNA<sup>leu</sup> with amino acids of the binding site also wasn't affected with mutation, in both cases Thr248 and Asp347 formed strong h-bonds with 3'OH group of ribose and amino group of leucine, respectively. At the same time, Thr247 residue, which was proven to be critical for the hydrolysis process, didn't form contacts with the carbonyl oxygen of leucine. Thus, even in the presence of water molecules the geometry of the aminoacyl is poorly suited the reaction requirements.

Similar study was conducted for Ala-tRNA<sup>Pro</sup> 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<sup>Pro</sup> 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.

Then two models were constructed for LeuRS systems from *T.thermophilus* and the molecular dynamics of complexes were carried out and analyzed. The results showed that the Nva-A76 substrate binds more strongly than Ile-A76. On the other hand, our simulation showed another possible cause of the difference in the rate of hydrolysis for Nva-tRNA<sup>Leu</sup> and Ile-tRNA<sup>Leu</sup> in the CP1 domain of LeuRS. MD simulation shows that the branched Ile-A76 side chain sterically impedes the approach of the attacking water molecules, resulting in a significant reduction in the rate of hydrolysis.

The molecular dynamics of the LeuRS<sup>Tt</sup> mutant form, which is critical for the editing activity by Asp347Ala substitution, revealed a number of structural differences in the binding of Nva- and Ile-tRNA<sup>Leu</sup> to the active center of the LeuRS editing domain, which may affect the selectivity during substrate hydrolysis. The hydrogen bonding network was analyzed and in the case of Ile-tRNA<sup>Leu</sup>, the hydrogen bonding rate with Thr247 / Thr248 is much lower than for Nva-A76. In general, these results confirm the results of dual LeuRS mutagenesis and, since the Thr247 and Thr248 mutations predominantly affect the reaction kinetics. However, one should note the important difference of the role of Thr248 in the mechanism presented by the Japanese group of Hagiwara et al., when during the hydrolysis process of Val-tRNA<sup>Leu</sup>, the lateral OH-group of Thr248 binds to the 3'-OH group of tRNAs, and A76 plays an important role in the initiator of the reaction. At the

same time, Mursinna and colleagues have shown that the post-transfer editing activity of the Thr248Ala mutant in LeuRS decreases only 1.5-fold relative to the activity of the wild-type enzyme.

Finally, our results support the hypothesis that the time of existence of bonds between the OH side chain Thr248 and the 3'-OH substrate is permanent for both types of substrates, despite the different rate of hydrolysis. In our 3'-OH model, the A76 tRNA<sup>Leu</sup> group and the Thr247 side chain OH group form hydrogen bonds with the norvaline carbonyl group. Thus, it indicates that new quantum-mechanical calculations of the LeuRS*Tt* post-transfer mechanism with the involvement of two water molecules are needed to avoid these contradictions.

The editing domain can be an evolutionary complement to the aminoacyl catalytic domain of IleRS, ValRS and LeuRS. The functional aspects of the editing mechanism in class 1A prokaryotic ARSases have already been extensively studied, and the mechanism of hydrolysis of improperly acylated tRNA has already been proposed for LeuRS*Tt*. However, eukaryotic and archaeal ARSases from this subclass are not studied to the same extent. Therefore, to compare the mechanisms of editing domain functioning, a LeuRS from *P.horikoshii* model was created in combination with tRNA<sup>Leu</sup>, where the tRNA acceptor branch was directed into the editing site. An analysis of the structure of LeuRS*Ph* revealed that the domain organization is common to the group of LeuRS, ValRS, and IleRS from *T.thermophilus*. Moreover, the CP1 domain consists of similar structural elements and possess the same sequence to those found for LeuRS of *C.albicans* and *H.sapiens*. So, it should be noted that the LeuRS editing site of *P.horikoshii* has a lot in common with the orthologous domains of bacterial LeuRS. Based on these findings, the conformations of the post-transfer editing substrates, Nva-76 and Ile-76, in the LeuRS*Ph* editing site were obtained. Despite the difference in interactions between tRNA<sup>Leu</sup> and enzymes from *T.thermophilus* and *P.horikoshii*, the binding of the post-transfer substrate is quite similar. As with the bacterial LeuRS*Tt*, the norvaline amino group forms H-bonds with Asp332 (identical to Asp347 in



LeuRSTt). Other important substrate fixers in LeuRSTt are Thr247 and Thr248, conservative elements of the threonine-rich motifs of bacterial enzymes. At the same time in archaeal LeuRS Thr248 is replaced by Leu230.

To investigate the possible mechanism of post-transfer editing reaction in LeuRSP $h$ , water molecules were localized near the carbonyl group of the amino acid to be hydrolyzed. According to the position of the hydrogen atoms and the angle of approach to the carbonyl carbon, two molecules were selected that met all the criteria. One of them (W1), an attack water molecule, is capable to attack an electrophilic carbonyl group to hydrolyze the ether bond. The attacking water molecule approaches the substrate on the opposite side in comparison to the case of LeuRSTt. This water molecule forms hydrogen bonds with the second molecule (W2), forming bridges of the H bond with the Thr234 residue. The second water molecule may also be involved in the process and further facilitate hydrolysis. The involvement of two water molecules in the hydrolysis of the erroneous product was also suggested by us for the mechanism of post-transfer editing of ProRS. The editing mechanism in LeuRSP $h$  is different from the one in LeuRSTt, the editing site of which can work with the involvement of a new hybrid ribozyme / protein catalyst to eliminate the erroneously activated tRNA<sup>Leu</sup>. In the model for LeuRSTt, it was proposed that the 3'-OH groups of the final A76 tRNA<sup>Leu</sup> activate water molecules and therefore participate in the cleavage of the ether bond. At the same time, in the LeuRSP $h$  the 3'-OH group of the terminal A76 is more than 3.5 Å away from the attacking water molecule. Thus, in the case of LeuRSP $h$ , it has not yet been shown that the 3'-OH group of the terminal A76-tRNA<sup>Leu</sup> is directly involved in the hydrolysis reaction.

MD results showed that the post-transfer substrate Nva-A76 binds more strongly than Ile-A76. The above hydrolysis mechanism is consistent with the Nva-A76 editing situation in LeuRSTt, which is considered to be the major (related) post-transfer substrate for LeuRS. At the same time, Ile-A76 binds less strongly to the editing site and is less open to water molecules, which makes this substrate less

suitable for hydrolysis. In general, these results correlate with biochemical data on bacterial LeuRS from E.coli when the rate of aminoacyl-tRNA hydrolysis, measured by the single-turnover single-turnover method for Nva-tRNA<sup>Leu</sup>, was significantly higher than the rate for Ile-tRNA<sup>Leu</sup>.

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

### **List of publications published on the topic of the dissertation:**

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, **Raevskiy AV**, Ilchenko MM, Dubey IY, Krikliiviy 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)*
6. **Raevskiy A**, Tukalo M. Molecular dynamics simulation study of *Thermus thermophilus* leucyl-tRNA synthetase with its 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 gene 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 X 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, **Раевский АВ**, Крикливый ИА, Коваленко ОП, Ильченко НН, Дубей ИЯ, Яремчук АД, Тукало МА. тРНК забезпечує точність синтезу пролил-тРНК<sup>Pro</sup> на двох етапах редагування продукту. XI Український біохімічний конгрес, 2014, 6-10 жовтня, Київ, Україна. Р. 16.

13. Бояршин КС, Присс АЕ, **Раевский АВ**, Крикливый ИА, 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 metabolic pathway of D-Tyr and editing of D-Tyr misaminoacylated substrates in *Thermus thermophilus*. 42nd FEBS congress from molecules to cells and back, 2017, 10-14 September, Jerusalem, Israel. P. 293.

16. Rybak MYu, Kovalenko OP, **Raevsky AV**, Ilchenko MM, Tukalo MA. 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.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	25
ВСТУП .....	26
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	32
1.1. Аміноацил-тРНК синтетази .....	32
1.1.1. Класифікація аміноацил-тРНК синтетаз .....	34
1.1.2. Модульна організація APCаз .....	36
1.1.3. Структурно-функціональні особливості будови APCаз .....	38
1.1.4. Транспортна РНК .....	40
1.1.5. Взаємодія APCаз із тРНК. Елементи розпізнавання .....	42
1.2. Еволюція APCаз на прикладі LeuRS .....	45
1.2.1. Механізм забезпечення специфічності APCаз .....	48
1.2.2. Механізми редагування на прикладі найбільш вивченої структури ThrRS .....	49
1.2.3. Будова аміноацилювального сайту на прикладі LeuRS .....	51
1.2.4. Елементи будови редагувального сайту на прикладі LeuRS .....	52
1.2.5. Редагувальний домен із проліл-тРНК синтетази <i>E.faecalis</i> .....	54
1.3. Методи дослідження функціональних особливостей структури синтетаз та механізмів реакцій редагування .....	56
1.3.1. Принципи молекулярної механіки .....	56
1.3.2. Квантово-механічні розрахунки .....	59
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	62
2.1. Пошук гомологів та структурних доменів з подібною амінокислотою послідовністю .....	62
2.2. Підготовка неканонічних органічних структур .....	63
2.3. Параметризація молекулярної динаміки .....	65
2.4. Аналіз траєкторії молекулярної динаміки .....	66
2.5. Гнучкий докінг молекули тРНК та лігандів .....	68

2.5.1. Налаштування програми HADDOCK .....	68
2.5.2. Використання FT-MAP серверу для оцінки якості докінгу .....	69
2.5.3. Молекулярний докінг у програмі GOLD.....	70
2.6. Програмне та технічне забезпечення.....	73
РОЗДІЛ 3. ВИЗНАЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ ОСНОВ СПЕЦИФІЧНОСТІ LEURS ПО ВІДНОШЕННЮ ДО АМІНОКИСЛОТИ ТА МОЖЛИВИХ МЕХАНІЗМІВ ПРЕ-ТРАНСФЕРНОГО РЕДАГУВАННЯ.....	75
3.1. Дослідження розташування амінокислот та АМР у аміноацилювальному сайті <i>LeuRSTt</i> .....	75
3.2. Вивчення аміноациладенілатів у активному сайті <i>LeuRSTt</i> та можливого механізму пре-трансферного редагування .....	81
РОЗДІЛ 4. ВИВЧЕННЯ МОЛЕКУЛИ АМІНОАЦИЛ-ТРНК ЯК ЕЛЕМЕНТУ СИЛОВОГО ПОЛЯ.....	85
РОЗДІЛ 5. ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДІВ ВИВЧЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ПОСТ- ТРАНСФЕРНОГО РЕДАГУВАННЯ .....	91
5.1. Валідація методу параметризації на прикладі <i>LeuRS</i> із <i>T.thermophilus</i> із спорідненим субстратом <i>Leu-tRNA<sup>Leu</sup></i> .....	91
5.2. Приклад проведення дослідження механізму гідролізу в INS домені <i>ProRS</i> із <i>E.faecalis</i> .....	94
РОЗДІЛ 6. ВИВЧЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ПОСТ-ТРАНСФЕРНОГО РЕДАГУВАННЯ В СПЕЦІАЛІЗОВАНИХ ДОМЕНАХ АРСАЗ РІЗНИХ ОРГАНІЗМІВ.....	101
6.1. Підготовка структур комплексів <i>LeuRS</i> .....	103
6.2. Вивчення редагувального домену <i>LeuRS</i> із <i>T.thermophilus</i> .....	103
6.2.1. Молекулярна динаміка комплексів <i>Nva-tRNA<sup>Leu</sup>-LeuRS</i> та <i>Ile- tRNA<sup>Leu</sup> -LeuRS</i> .....	104
6.2.2. Аналіз мутації <i>Asp347Ala</i> в CP1 домені <i>LeuRSTt</i> .....	108
6.3. Вивчення редагувального домену <i>LeuRS</i> із <i>P. horikoshii</i> .....	113

6.3.1. Моделювання комплексу LeuRS-tRNA <sup>Leu</sup> із <i>P.horikoshii</i> в редагувальному домені.....	114
6.3.2. Зв'язування пост-трансферних субстратів і можливий механізм гідролізу помилково аміноацильованої тРНК в редагувальному домені LeuRS <sup>Ph</sup> .....	117
РОЗДІЛ 7. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	122
ВИСНОВКИ.....	128
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	130
Додаток А.....	142
Додаток Б .....	146



**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

Å	-	ангстрем
AA	-	амінокислота
AD	-	термінальний аденозин тРНК
kJ	-	кілоджоуль
LeuRS	-	лейцил-тРНК синтетаза
PDB	-	Protein Data Bank
PME	-	Particle Mesh Ewald
ProRS	-	проліл-тРНК синтетаза
RMSD	-	середньоквадратичне відхилення
VdW	-	Ван дер Ваальсові взаємодії
АМФ	-	аденозинмонофосфат
АРСаза (АРС)	-	аміноацил-тРНК синтетаза
АТФ	-	аденозинтрифосфат
МД	-	молекулярна динаміка
нм (nm)	-	нанометр
нс (ns)	-	наносекунда
пс (ps)	-	пікосекунда
тРНК (tRNA)	-	транспортна РНК

## ВСТУП

**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 [1, 2]. Спеціалізація кожного з цих ферментів на упізнаванні однієї конкретної амінокислоти досягла рівня «надспецифічності» [20]. Цей рівень забезпечується, зокрема, функцією редагування [32].

АРСази використовують цілий набір редагувальних механізмів, а їх різноманітність відображає еволюційний шлях становлення генетичного коду і зростання точності білкового синтезу [2]. Важливим є те, чи механізм редагування має місце до переносу амінокислоти на тРНК, чи після [23]. Редагування помилок АРСазами на етапі відбору амінокислот або пре-трансферне редагування – це специфічний гідроліз продуктів, що виникли внаслідок зв'язування ферментом помилкової амінокислоти [27]. В той же час, редагування може відбуватися вже після зв'язування амінокислоти із тРНК – так зване пост-трансферне редагування [29].

Саме цей пост-трансферний 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 потрапляння абіогенної амінокислоти в ново синтезовані протеїни. Це дає потенційну можливість використання речовин, які блокують редагувальні активні центри АРСаз, в

якості протимікробних препаратів [89]. 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 гріду (<http://ung.in.ua/>) та Європейської грид-інфраструктури (<https://www.egi.eu/>).

**Мета і завдання дослідження.** Змоделювати 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.

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 топологій субстратів та провести молекулярну динаміку для отримання інформації про взаємодію всіх типів лігандів з амінокислотними залишками аміноацилювального та редагувальних сайтів.

4. Дослідити та проаналізувати структурні передумови забезпечення специфічності взаємодії різних лігандів під час аміноацилювання та механізм пре-трансферного редагування в аміноацилювальному сайті LeuRS*Tt*.

5. Передбачити та описати механізм реакції гідролізу пост-трансферних субстратів у редагувальних доменах LeuRS *T. thermophilus* та *P. horikoshii*.

*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, метод молекулярної динаміки, аналіз та інтерпретація енергії зв'язування лігандів, аналіз геометрії передреакційних комплексів

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше реконструйовані коректні 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. Створено окрему модель взаємодії ССА-кінця тРНК і димеру ProRS при пост-трансферному редагуванні. 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 організмів.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем здійснено інформаційний пошук та аналіз даних за темою роботи. У процесі виконання дисертаційної роботи автором проведено низку комп'ютерних моделювань, націлених на створення повноцінних 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); VIII 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); IX 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); 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 (всі входять до наукометричної бази даних Scopus) і 15 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 рисунків та 6 таблиць. Загальний обсяг дисертації складає 147 сторінок.

\*\*\*

Дисертант висловлює щирю подяку науковому керівнику завідуву відділу ензімології білкового синтезу ІМБіГ НАНУ, д. б. н., проф. М. А. Тукало за наукове керівництво та обрання актуальної теми дисертаційної роботи, допомогу при інтерпретації отриманих результатів та написанні дисертаційної роботи. Автор дякує за поради та допомогу під час проведення досліджень та аналізу результатів, а також за поради щодо параметризації молекулярних топологій досліджуваних лігандів Голові Групи Молекулярного Дизайну компанії Life Chemicals Inc., к.б.н. Голубу А.Г., к.х.н. Ільченку М. М. за підготовку та проведення квантово-механічних розрахунків, Корнелюку О.І. за надання права користування віртуальною лабораторією Молдінгрід та адміністратору кластера Савицькому О.В. за суттєву та своєчасну допомогу.

Також автор дякує колективу відділу за консультації при плануванні експериментів.

Особлива подяка сім'ї за розуміння та підтримку під час виконання дисертаційної роботи.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Аміноацил-тРНК синтетази

Реакція специфічного приєднання амінокислот до тРНК, аміноацилювання або «навантаження», здійснюється ферментами АРСазами, здатними розпізнавати три різних субстрати: АТФ, амінокислоту і, власне, тРНК (рис.1.1). В аміноацилювальному сайті молекули ферменту здійснюється, так звана, активація амінокислоти і в результаті хімічних перебудов формується ковалентний зв'язок між карбоксильною групою амінокислоти та  $\alpha$ -фосфатною групою АТФ, та утворюється проміжний продукт реакції аміноациладенілат, в результаті чого з активного центру ферменту вивільнюється пірофосфат. Далі відбувається процес перенесення активованої амінокислоти з аденозину на тРНК — з АРСазою зв'язується відповідна тРНК, після чого відбувається ковалентне приєднання амінокислоти до 2'- або 3'-ОН групи кінцевого нуклеотиду тРНК (A76), в залежності від класу ферменту, та вивільнення АМФ. Окремо треба виділити процес редагування помилок, що може відбуватися, як одразу після утворення аміноациладенілату (пре-трансферне редагування), так і після приєднання амінокислоти до 3'-кінця тРНК (пост-трансферне редагування). Якщо особливості пре-трансферного редагування залежать лише від наявності чи відсутності молекули тРНК, то механізм пост-трансферної редагувальної активності визначається, в першу чергу, особливостями доменної організації конкретного представника класу.



Для кожної амінокислоти в клітині існує відповідна аміноацил-тРНК синтетаза (АРСаза), здатна відрізнити свою амінокислоту від інших, часто дуже схожих за структурою [1, 2]. Фермент повинен також розпізнавати тРНК, антикодон якої відповідає даній амінокислоті. А за умови наявності ізоакцепторних тРНК, здатних аміноацилюватися амінокислотою, спільною для всіх ізоакцепторних тРНК, має забезпечуватись надзвичайно висока точність розпізнавання споріднених амінокислот.

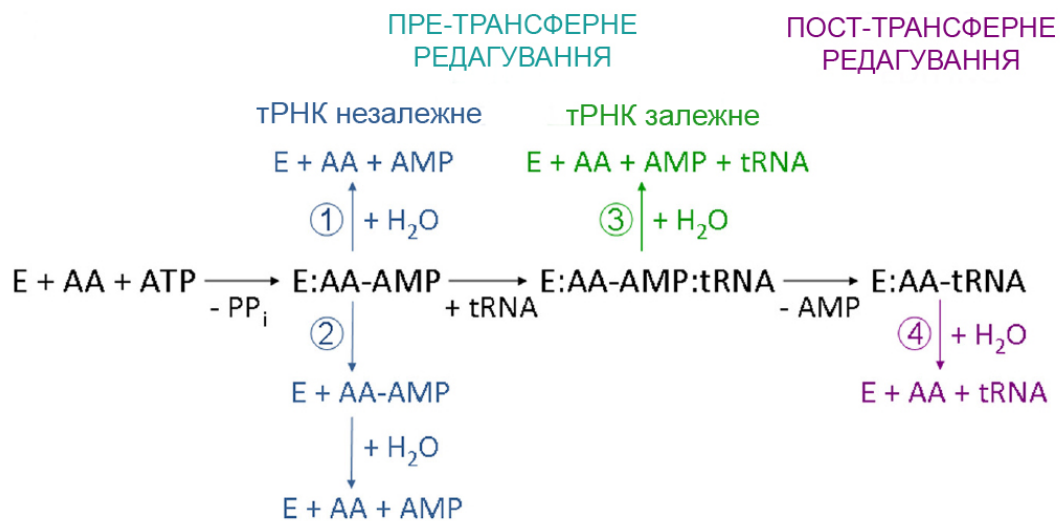


Рис. 1.1. Схематичне зображення (різними кольорами) шляхів редагування 1-4. Пре-трансферне редагування відбувається за рахунок дисоціації (шлях 2) помилкового аміноациладенілату або ферментативного гідролізу (шляхів 1 і 3), який може бути тРНК-незалежним (шлях 1) або тРНК-залежним (шлях 3). Після переносу неправильно аміноацильована тРНК може деацилюватися під час пост-трансферного редагування (шлях 4). Схема основного шляху (чорний) демонструє процес активації амінокислоти, зв'язування тРНК та аміноацилювання як «правильної» і «неправильної» амінокислоти

Отже, АРСази повинні мати здатність розпізнавати не тільки свою амінокислоту, але й набір споріднених тРНК серед великої кількості (близько 65 в еукаріотичній клітині) подібних за будовою чужих тРНК. Від точності

цього розпізнавання в результаті залежить правильність реалізації генетичної інформації у процесі біосинтезу білка, в якому цей багатоступеневий процес є чи не ключовим.

До появи білкових АРС, їхні функції виконували молекули РНК, що підтверджено штучно створеними рибозимами, здатними аміноацилювати свій 3'-кінець або 3'-кінець тРНК [3]. Пізніше АРС-рибозими були заміщені білками, що походять від двох предкових послідовностей [4]. Отже, структурно всі АРС можна поділити на два великі класи.

**1.1.1. Класифікація аміноацил-тРНК синтетаз.** Протягом довгого часу єдиною рисою групи ферментів АРСаз вважалося їхнє дивовижне розмаїття. Незважаючи на те що ці білки каталізують одну й ту саму реакцію, вони надзвичайно різноманітні за розміром, субодиничною будовою і амінокислотною послідовністю. Навіть за допомогою сучасних комп'ютерних програм не вдавалося виявити подібності між усіма 20 АРСазами ані на рівні первинної послідовності, ані за елементами просторової структури. Ця загадка була вирішена тільки в 1990 році французькими дослідниками [5, 6]. Виявилось, що між усіма АРСазами дійсно немає подібності, але їх можна розділити на два класи і всередині кожного з класів виявляються характерні послідовності амінокислот (так звані мотиви) та подібні елементи третинної структури.

Первинна класифікація АРСаз була заснована лише на наявності взаємовиключних мотивів (табл. 1.1). Десять із двадцяти АРСаз із *E. coli* містять два характерних мотиви: перший складається з 11 амінокислот, що закінчуються на загальну для всіх АРСаз I-го класу послідовність HIGH, другий — являє собою консервативний пентапептид KMSKS. До того ж, ферменти I-го структурного класу легко розпізнати за третинною структурою аміноацилювального домену, представленого  $\beta$ -складчатими листами, франкованими  $\alpha$ -спіралями, що мають назву згортки Россмана [7]. Їх легко

визначити за двома короткими консервативними патернами, що формують частину АТФ-зв'язуючого сайту [8], а також стабілізують 3'-кінець тРНК під час приєднання активованої амінокислоти до тРНК на другому етапі реакції [9].

Таблиця 1.1

### Класифікація синтетаз

Class I		Class II	
Ia	Ib	IIa	IIb
LeuRS	GluRS	SerRS	AspRS
IleRS	GlnRS	ThrRS	AsnRS
ValRS	Ic	AlaRS	IIc
ArgRS	TyrRS	GlyRS	PheRS
CysRS	TrpRS	ProRS	
MetRS		HisRS	

У структурі інших 10 АРСаз, яких віднесли до II-го класу, можна визначити три інших мотиви, що залучені до розпізнавання, взаємодії із тРНК, зв'язування АТФ та димеризації. Перші дві послідовності характеризуються не стільки консервативною послідовністю, скільки порядком чергування амінокислот з гідрофобними та гідрофільними радикалами. Вони відповідають за здійснення каталітичної функції ферменту, а саме, зв'язують субстрати реакції [6, 10]. Ці два консервативні мотиви АРСаз класу II не мають аналогів у структурах АРСаз класу I [6] Третій каталітичний мотив можна порівняти із мотивами HIGH та KMSKS АРСаз класу I, оскільки цей мотив має схожу функцію, відповідаючи за зв'язування АТФ. Така вельми віддалена схожість пояснюється функціональністю: виявилось, що всі АРСази I-го класу приєднують амінокислоту до 2'-ОН групи рибозного залишку кінцевого нуклеотиду тРНК, а АРСази II-го класу — до 3'-ОН групи (винятком є PheRS). Крім того, виявилось, що зазначені мотиви дійсно взаємовиключні, тобто не виявлено білків, в яких би були водночас присутні послідовності, характерні для I-го класу АРСаз, і один з мотивів, характерний для II-го класу. За

гомологією первинних структур та особливостями доменної організації кожен із класів додатково розділений на підкласи (табл. 1.1).

З точки зору структурно-функціональних особливостей можна вивести наступні закономірності у класифікації АРСаз:

1. Ферменти I-го класу в основному мономери, а в 2-му класі зустрічаються лише олігомери.

2. АРСази I-го класу аміноацилюють тРНК, частіше, амінокислотами з об'ємним гідрофобним радикалом, наприклад: тирозином, триптофаном, лейцином (виняток становить фенілаланін), у той час як амінокислоти з невеликими нейтральними радикалом (гліцин, аланін) розпізнаються АРСазами II-го класу.

3. З двох амінокислот із подібними зарядженими радикалами (наприклад, аспартат-глутамат, лізин-аргінін) амінокислота з більшим радикалом активується АРСазою I-го класу, а з меншим — АРСазою II-го класу. Останній постулат можна пояснити за допомогою даних рентгеноструктурного аналізу: показано, що активний центр АРСаз I-го класу представляє собою неглибоку виїмку на поверхні молекули білка і передбачає суттєвий вклад Ван дер Ваальсових взаємодій, а АРСаз II-го класу — глибоку та вузьку кишеню, яка більше підходить для селекції дрібних амінокислотних залишків.

**1.1.2. Модульна організація АРСаз.** Відомо, що ці ферменти мають, так звану, модульну структуру. Вони складаються з окремих доменів, або модулів, що перетасовані один відносно іншого. Різноманітні за довжиною і за структурою модулі розташовуються не тільки на кінцях білкової молекули, а й усередині центральної каталітичної частини, яка містить аміноацилювальний центр ферменту. Такі вставки різної довжини виявлені між елементами, що формують активний центр (наприклад, між окремими  $\beta$ -тяжами), і навіть між консервативними мотивами (рис. 1.2).

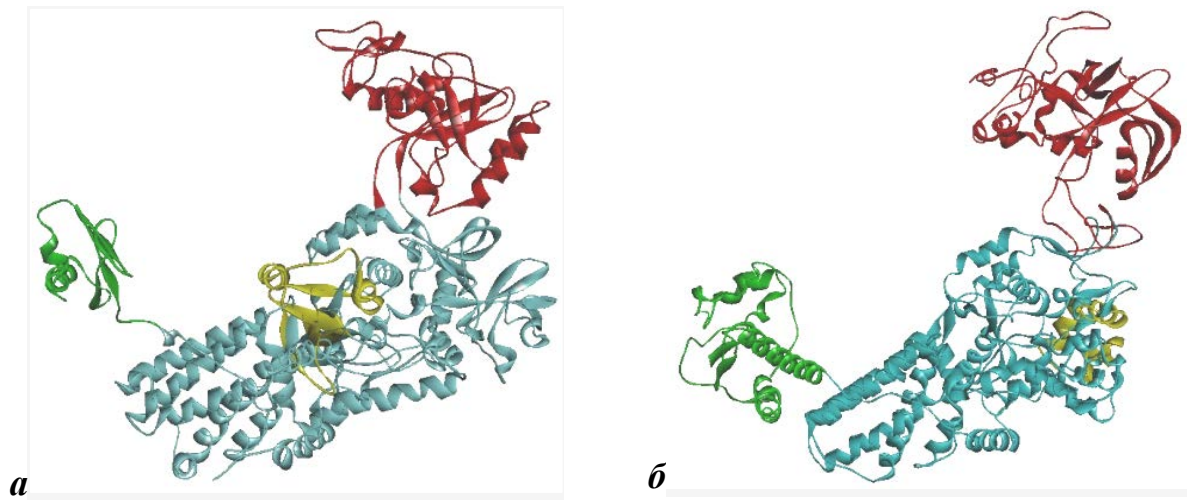


Рис. 1.2. Особливості модульної будови LeuRS із організмів *T.thermophilus* [1OBC] (а), *P. horikoshii* [1WKВ] (б): редагувальний домен (показано червоним), каталітична частина (блакитний), С-домен (зеленим), характерний мотив (жовтим)

При формуванні просторової структури ці додаткові модулі випетлюються, утворюючи окремі домени. Однак, саме через це, при розгляді амінокислотної послідовності молекули білка створюється помилкове враження, що АРСази надзвичайно різноманітні і не мають нічого спільного між собою.

Таким чином, загальна закономірність будови АРСаз — це наявність центральної частини, яка містить активний центр, і додаткових модулів, утворених кінцевими подовженнями і вставками між елементами корової структури. Власне саме додаткові модулі визначають велику різноманітність розмірів і властивостей цих ферментів. Наприклад, АРСази, що приєднують одну і ту ж амінокислоту, у прокариотів і еукаріотів можуть мати подібну молекулярну масу, але різні додаткові модулі. До того ж для АРСаз еукаріот характерні N-кінцеві подовження, а для АРСаз прокариотів — С-кінцеві подовження і вставки між мотивами [5].

Модульна будова АРСаз забезпечує їх функції: зв'язування трьох субстратів, каталіз, об'єднання кількох субодиниць у олігомери. Функції

зв'язування АТФ і амінокислоти реалізуються в каталітичному центральному домені. У олігомерних АРСаз існує спеціальний домен, відповідальний за взаємодію субодиниць. Функція зв'язування тРНК розподілена між двома доменами білка, що окремо здійснюють зв'язування різних ділянок молекули тРНК [11]. В L-подібній просторовій структурі тРНК можна виділити два основних патерни, або дві гілки, що розташовані під кутом  $90^\circ$ . Перший являє собою аміноакцепторне стебло, тут до послідовності нуклеотидів ССА на 3'-кінці приєднується амінокислота, і продовження аміноакцепторного стебла — Т-гілка тРНК. Другий - складається з антикодонової та дигідроуридинової шпильки. Виявилося, що зв'язування аміноакцепторної частини тРНК здійснюється у всіх АРСаз доменом, розташованим усередині центральної каталітичної частини ферменту в одній з вставок між консервативними мотивами [12].

Домен, що зв'язує антикодонову гілку тРНК, завжди розташовується окремо від каталітичного в С- або N-кінцевому подовженні, причому структура цих доменів дуже відрізняється у різних АРСаз.

Еукаріотичні АРСази, крім корової (каталітичної) часто мають певні N- або С-кінцеві подовження, характерні тільки для них. Сюди відносяться, в першу чергу, додаткові тРНК-зв'язуючі домени, лізин-збагачені домени, повторювані мотиви, домени гомологи ЕМАРІІ, і домени, необхідні для утворення мультисинтетазних комплексів, характерних для еукаріот [5].

**1.1.3. Структурно-функціональні особливості будови АРСаз.** Вся інформація про кристалічні структури синтетаз знаходиться в базі даних протеїнів RCSB [13] Структура бактеріальної LeuRS із *T. thermophilus* (PDBID: 2V0G, 2BTE, 1OBC, 1OBN) досліджена досить добре. Принципово важливим у виборі організму для дослідження механізмів реакції і селективності були як накопичений досвід та матеріали, так і легкість особливості роботи із термофільними білками. Так в даних структурах можна побачити

конформаційні відмінності між субстратами пре-трансферного та пост-трансферного редагування, потенційні лікарські засоби, що знаходяться в редагувальному домені та дослідити інтермедіат аміноацилювання в аміноацилювальному сайті. До того ж декілька повноцінних комплексів із тРНК дають величезну перевагу стосовно розуміння принципів взаємодії, що є необхідним для реконструкції подібних структур за відсутності якогось із компонентів.

Так для архейних синтетаз лейцинового типу (PDBID: 1WZ2, 1WKB) із *P. horikoshii* немає жодних даних щодо орієнтації субстратів в редагувальному домені, або аміноацилювальному сайті. Проте є комплекс із тРНК. Використовуючи аналітичні інструменти можна порівняти структури LeuRS *S. albicans* (2WFG) та ValRS із *T. thermophilus* (1GAX). В решті решт, всі необхідні комплекси було змодельовано та перевірено в даній роботі.

Кристалічна структура ProRS із *Enterococcus faecalis* також доступна в базі даних (PDBID: 2J3L, 2J3M) і хоча структура комплексу із тРНК існує, але досі не опублікована. До того ж доступна лише конформація стебла тРНК із ССА-кінцем, направленим в аміноацилювальний сайт, так само, як і у випадку із архейною лейциновою синтетазою.

Як вже було сказано, для АРСазних комплексів характерний ряд структурних відмінностей. Так мотиви первинної структури зближені в третинній структурі каталітичних доменів обох класів АРСаз. Відрізняється і просторова орієнтація молекул тРНК при їх зв'язуванні з АРС обох класів. АРС першого класу стикуються з акцепторним стеблом тРНК з боку малого жолобу, в той час як другий клас контактує з ним із боку великого. Відповідно, варіабельна петля тРНК, що відповідають АРСазам I класу, експонована у розчин, а в разі АРСаз II класу — контактує із глобулою ферменту [14]. Втім, ця закономірність має свої винятки, TyrRS і TrpRS першого класу взаємодіють з тРНК саме шляхом, характерним для ферментів другого класу [15, 16].

Різні способи зв'язування акцепторного стебла тРНК двома класами АРС обумовлюють відмінність в характері прикріплення амінокислот. Як правило, АРСазі першого класу переносять амінокислотні залишки на 2'-гідроксильну групу рибози А76 тРНК, у той час як ферменти другого класу — на 3'-гідроксильну групу. Винятком є ФенРС другого класу, тут прикріплюється залишок фенілаланіну до кисню 2'-ОН групи. А такі представники першого класу, як TyrRS, TrpRS, CysRS, можуть переносити амінокислотні залишки як на 2'-, так і на 3'-ОН групу [17, 18].

Недоліками наявних кристалів білково-нуклеїнових структур є відсутність занадто рухливої антикодонової петлі у лейциновому комплексі та напрямок ССА кінця в тРНК у проліновій системі. Раніше вже було проведено ряд досліджень цих об'єктів методами молекулярного докінгу і молекулярної динаміки. Проте тоді використовувалися лише окремі домен та олігонуклеотидний ланцюг тРНК.

**1.1.4. Транспортна РНК.** Функція тРНК полягає в транспортуванні амінокислот до місця білкового синтезу. Усього в клітині одночасно існує до 64 різних ізоакцепторних тРНК. Більшість тРНК молекул, не залежно від їх нуклеотидної послідовності, мають вторинну структуру із характерними трьома шпильками (рис.1.3).

На 3'-кінці молекули завжди знаходяться чотири неспарених нуклеотида, причому три з них — це обов'язково ССА. 5'- і 3'-кінці ланцюга тРНК утворюють акцепторне стебло. Ланцюги утримуються разом завдяки комплементарності семи нуклеотидів 5'-кінця з сімома нуклеотидами нижче ССА 3'-кінця. У всіх молекул є шпилька ТΨС, названа так через те, що вона містить два незвичайних залишки: риботимідин (Т) і псевдоуридин (Ψ). Шпилька складається з дволанцюгового стебла з п'яти спарених основ, включаючи пари GC, і петлі довжиною в сім нуклеотидів.



Тринуклеотид ТЦС завжди розташований в одному і тому самому місці петлі ТЦС шпильки. В антикодоновій шпильці стебло завжди представлене сімома спареними основами. Триплет, комплементарний спорідненому кодону, називається антикодон і знаходиться в петлі, що складається із семи нуклеотидів. З 5'-кінця антикодон фланкують інваріантний залишок урацила та модифікований цитозин. А до його 3'-кінця прилягає модифікований пурин, як правило аденін. Ще одна шпилька складається зі стебла довжиною три-чотири пари нуклеотидів і петлі, розмір якої варіює, до того ж вона містить урацил у відновленій формі — дигідроурацил (DHU). Найбільш сильно варіюють нуклеотидні послідовності стебел, число нуклеотидів між антикодоновим стеблом і стеблом ТЦС (варіабельна петля), а також розмір петлі й локалізація залишків дигідроурацила в DHU-петлі.

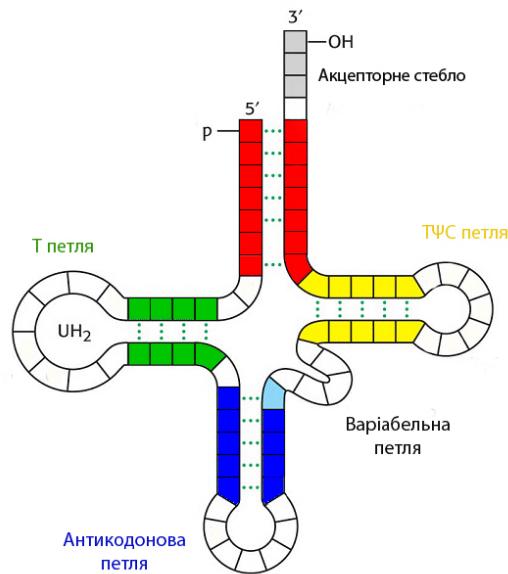


Рис. 1.3. Схематична будова та функціональні елементи молекули тРНК

Третинна структура тРНК відповідає реальній просторовій структурі. Вона одержала назву L-форми, через подібність третинної структури до форми латинської великої букви «L» [19].

Третинна структура утворюється завдяки взаємодії елементів вторинної структури. В її формуванні беруть участь стекінг-взаємодії основ. За рахунок

стекинга основ акцепторне і Т-стебло конюшинового листа утворюють одну безперервну подвійну спіраль, що формує одну з «паличок» L-форми. Антикодонове і D- стебла утворюють іншу «паличку» цієї букви, D- і Т-петлі виявляються в такій структурі зближеними й скріплюються між собою шляхом утворення додаткових, часто незвичайних пар основ, які, як правило, утворені консервативними або напівконсервативними залишками. У світлі такої участі консервативних і напівконсервативних основ в утворенні L-форми стає зрозумілою їх присутність в Т- і D-петлях.

Транспортні РНК у всіх живих організмах послідовно виконують три функції, необхідні для здійснення синтезу білка:

1) акцепторну — за допомогою білкових ферментів (АРСаз) ковалентно приєднує до кінцевого гідроксильної групи рибози кінцевого аденозину тРНК (ССА 3'-кінець) певну амінокислоту (для кожної амінокислоти — «своя» (відповідна) одна або іноді декілька різних тРНК);

2) транспортну — транспортує амінокислоту до специфічного місця на рибосомі;

3) адапторну — у комплексі з рибосоною здатна специфічно впізнавати триплет генетичного коду на інформаційній РНК, після чого приєднана до тРНК амінокислота включається в зростаючий поліпептидний ланцюг на рибосомі.

#### **1.1.5. Взаємодія АРСаз із тРНК. Елементи розпізнавання.**

Найважливішим етапом будь-якого процесу в молекулярній біології є правильна диспозиція двох реагуючих одиниць. Розташування елементів, що можуть утворювати водневі зв'язки та забезпечувати щільні контакти між двома поверхнями синтетази та молекули нуклеїнової кислоти, ініціює більш точний процес розпізнавання субстрату [20].

При порівнянні просторових структур молекула тРНК не дуже відрізняється за величиною від молекули (або субодиниці) ферменту і

взаємодіє з ним, в основному, в області антикодону і акцепторної ділянки тРНК. Транспортні РНК контактують з АРСазами різних класів, наближаючись до них різними сторонами, як би різними боками, що, безсумнівно, важливо для правильної орієнтації в активному центрі ферменту або 2'-, або 3'-гідроксильної групи рибози. При взаємодії з ферментом молекула тРНК зазнає конформаційних змін: змінюється характерна просторова організація антикодонової петлі, в результаті чого азотисті основи нуклеотидів антикодону як би всовуються в окремі кишені, сформовані відповідним доменом АРСази. При взаємодії з АРСазами I-го класу спостерігається також значне згинання аміноакцепторної ділянки тРНК в області кінцевих неспарених нуклеотидів. За останні роки накопичено великий обсяг фактичного матеріалу про те, які нуклеотиди тРНК важливі для правильної взаємодії з АРСазою [21]. Виявилось, що заміна двох-трьох нуклеотидів може призвести до повної втрати аміноакцептуючої здатності тРНК. І навпаки, введення такого ж поєднання нуклеотидів в аналогічні ділянки іншої тРНК може викликати переключення її специфічності, при якому мутантна тРНК набуває здатність взаємодіяти з іншою АРСазою [22] і, отже, аміноацилюватися іншою амінокислотою. Шляхом штучної перестановки таких ключових нуклеотидів можна отримати химерні тРНК. Наприклад, з Asp-tRNA вдалося за допомогою направленого мутагенезу отримати тРНК, здатну акцептувати аланін, фенілаланін і валін, але не аспартат. Звичайно, таке можливо тільки *in vitro*, в умовах надлишку ферментів, оскільки в клітині АРСази конкурують між собою за тРНК і здійснюються тільки взаємодії, максимально вигідні кінетично.

Підсумовуючи вище сказане:

1. Елементи розпізнавання можуть розташовуватися в різних ділянках молекули тРНК. Для кожної АРСази характерний свій набір елементів.
2. Нуклеотиди антикодону бувають необхідні для точного аміноацилювання, але не для всіх АРСаз.

3. Аміноакцепторна ділянка тРНК завжди містить хоча б один нуклеотид, важливий для розпізнавання тРНК відповідною АРСазою.

Виявлені також антидетермінанти аміноацилювання, що перешкоджають взаємодії тРНК з чужою АРСазою. Як правило, це модифіковані нуклеотиди. Кристалічна структура комплексу  $tRNA^{Leu}$  з ферментом LeuRS із *T. thermophilus* показує, що С-кінцевий домен взаємодіє із задньою стороною «ліктя» тРНК, біля G19: C56 пари основ (рис. 1.4.).

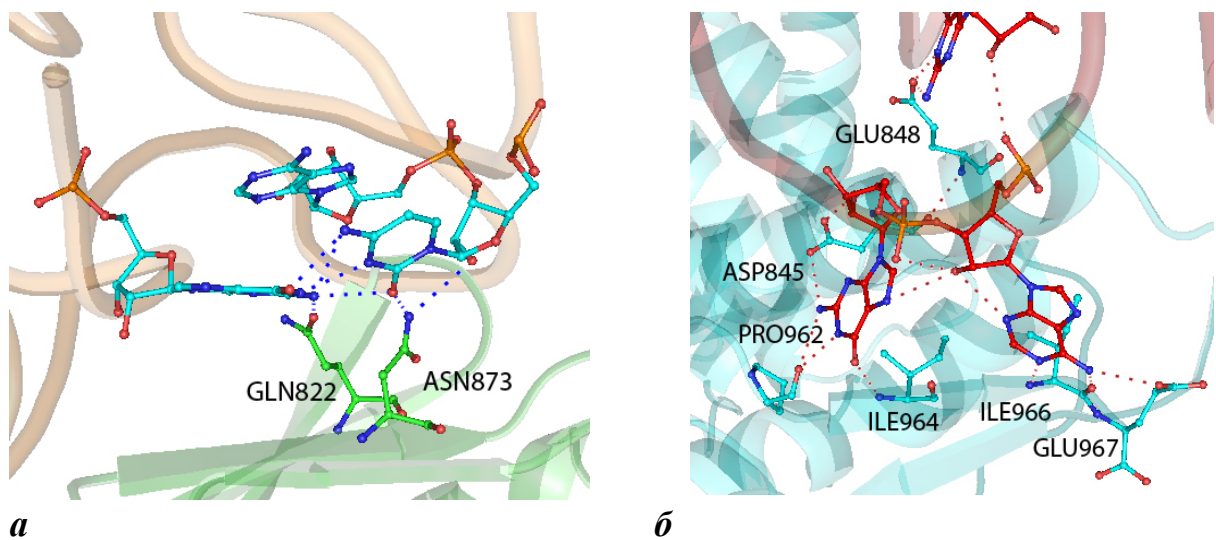


Рис. 1.4. Демонструє спрощення механізмів зв'язування  $tRNA^{Leu}$  з LeuRS на прикладі контактів D-гілки та D-петлі тРНК із амінокислотами С-домену. Структури зв'язуючих елементів еубактеріальної [2V0G] (а) та археальної [1WZ2] системи (б)

В свою чергу, для стабілізації комплексу LeuRS- $tRNA^{Leu}$  *E.coli* в аміноацилювальній конформації характерна участь залишка основи A73 [23]. А у *P. horikoshii*, на відміну від *T. thermophilus*, С-кінцевий домен взаємодіє із довгою варіабельною гілкою своєї тРНК під час аміноацилювання [24]. За відсутності тРНК, С-кінцевий домен рухливий, його структура неупорядкована. Вивчення еволюційних змін в структурі синтетаз дає можливість простежити ускладнення або спрощення механізму редагування та пояснити послідовність подій.

## 1.2. Еволюція APCаз на прикладі LeuRS

LeuRS це один із 20 ферментів, що відповідають за приєднання аліфатичної амінокислоти лейцину до шести різних ізоакцепторних  $tRNA^{Leu}$ , у кожній з яких різний антикодон. Незважаючи на те, що APCази точно розпізнають «свої» антикодони при відборі тРНК, LeuRS працюють по-іншому, можливо, тому що антикодони відповідних  $tRNA^{Leu}$  настільки різноманітні [25]. Замість звичайного механізму LeuRS впізнає залишок аденозина в положенні 76 (A76). Це положення тРНК відоме як «дискримінатор» і розпізнається багатьма APCазами. Крім того, архейна LeuRS і більшість еукаріотичних LeuRS розпізнають довгу варіабельну гілку своєї  $tRNA^{Leu}$ . Але сам процес впізнавання дискримінатора та довгої варіабельної гілки поки не описаний. Інша цікава особливість LeuRS полягає в тому, що в них є коригувальна (редагувальна) ферментативна активність. Іноді аміноацилювальний домен неправильно аміноацилює схожі амінокислоти, такі як ізолейцин та метіонін, і помилково аміноацилює 3'-кінець  $tRNA^{Leu}$ . Якщо ці місаміноацили Ile- $tRNA^{Leu}$  і Met- $tRNA^{Leu}$  потраплять на рибосому — будуть синтезуватися мутантні білки. Щоб запобігти цьому, «редагувальний домен» LeuRS гідролізує неправильну аміноацил-тРНК і сприяє швидкому і точному відбору амінокислот для подальшого синтезу білку.

У різних синтетазах необхідність редагування помилок призводила до появи або нових доменів, або нових функцій. Це стосується CP1 домену та пост-трансферного редагування і тРНК-залежного/незалежного пре-трансферного редагування. тРНК залежне редагування пов'язане із глибинними перебудовами у молекулі глобули в результаті зв'язування молекули тРНК [26]. Це можна спостерігати на прикладі IleRS, ValRS, LeuRS. Ці синтетази із Ia класу мають дуже високий ступінь гомології. Вважається, що вони мали спільного предка, який був не здатний відрізнити споріднені

амінокислотні залишки, а потім дивергував у три різні ферменти раніше за інших синтетаз цього класу (рис. 1.5).

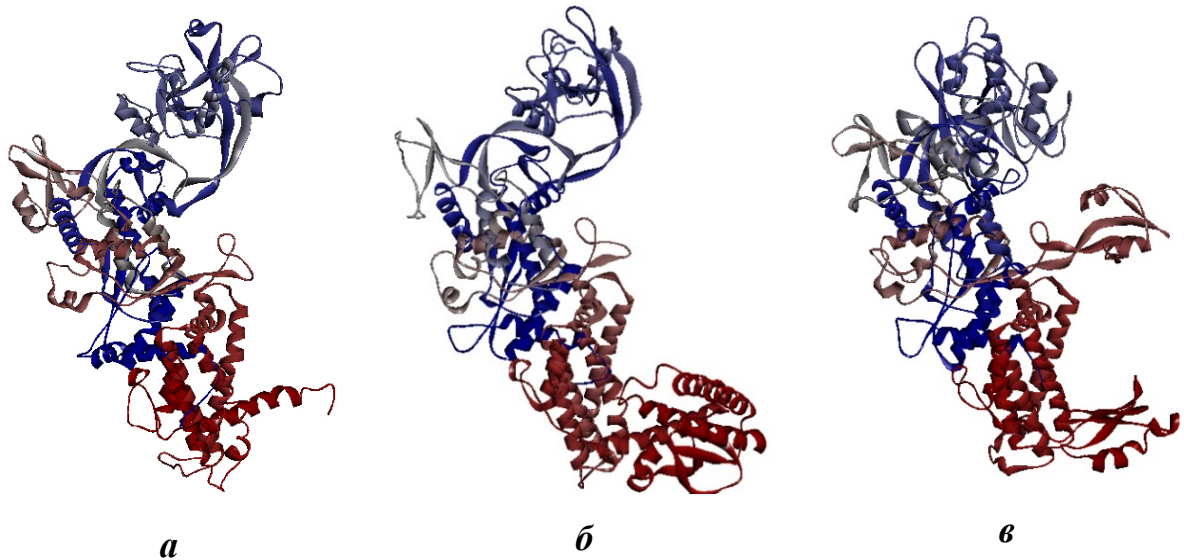


Рис. 1.5. Ряд гомологічних синтетаз із організму *T. thermophilus*, що утворюють еволюційну групу: ValRS [1GAX] (а); IleRS [1ILE] (б); LeuRS [2V0G] (в)

Всі три ферменти достатньо великі і є мономерами та мають велику вставку, а саме CP1 домен, що включає зв'язуючі амінокислоти та треонін-збагачену ділянку [27]. До того ж цей домен дуже схожий у бактеріальних Ile-ValRS та еукаріотичної і археальної LeuRS. Не дивлячись на це, є досить великі відмінності у його орієнтації та просторовому положенні (рис 1.6). По-перше, LeuRS архей виділяють у окрему групу і зв'язують тРНК, яка включає довгу варіабельну петлю. По-друге, окрім схожої корової частини археальний CP1 домен включає не 200 аа, як бактеріальний, а приблизно на 50 амінокислотних залишків більше.

На даний момент механізм пост-трансферного редагування представлений декількома схемами. На основі структурних і біохімічних даних була запропонована модель, в якій гнучкий 3'-кінець неправильно аміноацильованої тРНК переміщався з аміноацильовального активного центру

до редагувального домену, де і відбувався гідроліз. Проте пре-трансферний механізм редагування менш вивчений.

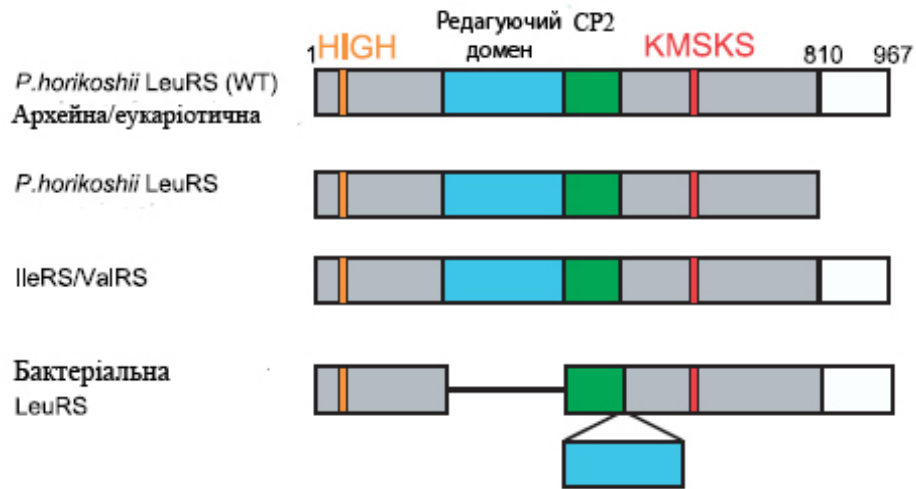


Рис. 1.6. Схематичне зображення структур синтетаз LeuRS, ValRS, IleRS із *T. thermophilus* і LeuRS (C-домен обрізаний) із *P. horikoshii*. Особливий інтерес для нас представляє розташування редагувального домену

Цікавим прикладом зміни парадигми є процес вивчення редагування IleRS. З початку і досить довго основною моделлю вважалось «післяніцаційного пре-трансферного редагування» [28]. У цій моделі початковий етап пре-трансферного редагування викликає конформаційні зміни в CP1 домені, який набуває «активної» форми. Проте, останні дослідження показали, що пре-трансферне редагування забезпечує лише третину від усіх виправлених помилок [29].

Щодо LeuRS рентгеноструктурний аналіз структур прокаріотичної та архейної синтетази показав, що аміноацилювальний та редагувальний активні сайти архейної синтетази без тРНК *Pyrococcus horikoshii* знаходяться на відстані 35 Å, що відрізняється від 30 Å у *T. thermophilus* [30]. До того ж ніякого каналу між ними нема. Тому переміщення аміноациладенілата (AA-AMP) з одного сайту до іншого не відриваючись від поверхні білка не можливе. З іншого боку, недавнє дослідження GluRS з I класу, у якої зазвичай відсутня редагувальна функція, виявив, що реакція схожа на тРНК-залежне

пре-трансферне редагування може відбуватися безпосередньо в аміноацилювальному активному сайті.

**1.2.1. Механізм забезпечення специфічності АРСаз.** Повертаючись до модульної організації ферментів треба окремо розглянути редагувальний домен. Відомо, що АРСзи редагують кінцевий продукт для забезпечення точного приєднання правильної амінокислоти до тРНК. Як вже було сказано, проблема полягає у розрізненні хімічно подібних амінокислот. Зокрема в нашому випадку, лейцин, ізолейцин та норвалін відрізняються лише положенням метильної групи. Лайнус Полінг вирахував, що одноетапне розпізнавання ізолейцину та валіну термодинамічно неможливе [31].

Подібні помилки в разі мутації ізолейцин/валін можуть бути шкідливими і навіть катастрофічними з біологічної точки зору. Так навіть одна подібна мутація в середині ядра рибонуклеази Т1 знижує її стійкість через зменшення взаємодії бічного ланцюга в укладці білка. Така мутація в гідрофобному ядрі інгібітора хімотрипсину змінює вільну енергію декомпактизації ( $DDG_{U-F}$ ) в середньому на  $5,0 \pm 0,4$  кДж/моль. А точкова мутація в середині лізоциму людини призводить до зниження стійкості до денатурації ( $DDG$  від  $-1.5$  -  $5.0$  кДж/моль). Ця мутація також збільшує вірогідність розвитку раку легень і впливає на стійкість вірусу імунодефіциту людини до ліків.

Інша проблема, що була визначена Полінгом, полягає в тому, що сайт зв'язування ферменту може легко виключити молекули, які не відповідають за розміром. Алан Фершт вперше запропонував гіпотезу механізму «подвійного сита» у 1977 році [32]. Відповідно до гіпотези А. Фершта, сито з великими отворами виключає більшість великих амінокислот та пропускає менші амінокислоти, серед яких є і одна «правильна». Далі дрібне сито гідролізує продукти, утворені з менших амінокислот. У 1998 році було продемонстровано (Nureki. et al.) наявність механізму подвійного сита в PeRS



[33]. Було отримано кристалічну структуру PeRS із *Thermus thermophilus*, а також її комплекси із Pe-AMP і Val-AMP. PeRS містить характерний нуклеотид-зв'язуючу укладку в активному центрі. Сито з великими отворами представляє собою щілину з двома характерними послідовностями чотирьох амінокислот, які зв'язують АТФ. Групи  $\text{NH}_3^+$  і  $\text{COO}^-$  групи ізолейцину утворюють контакти із стратегічно розташованими амінокислотними залишками ферменту. Цей сайт може виключати великі амінокислоти через стеричні умови, у тому числі L-лейцин, хоча він відрізняється від ізолейцину тільки розміщенням метильних груп бічного ланцюга. Це контрастує із звичайною лабораторною органічною хімією, де «лейцин і ізолейцин дуже важко розрізнити». Дрібне сито це відокремлений структурний домен (наприклад, CP1 у LeuRS та INS у ProRS). На прикладі PeRS показано, що редагуватися може валін, але не лейцин чи ізолейцин [34]. Розміри сайту занадто малі і неправильний продукт із валіну гідролізується, а правильні продукти із ізолейцину не потрапляють у центр для гідролізу. Мутації цього домену виявили зростання помилок.

**1.2.2. Механізми редагування на прикладі найбільш вивченої структури ThrRS.** Треоніл-тРНК синтетаза (ThrRS) вимагає для активації амінокислот координування гідроксильної групи бічного ланцюга [35], яка взаємодіє з іоном  $\text{Zn}^{2+}$  в аміноацилювальному активному центрі, і відкидає серин, який просторово дуже схожий на треонін [36]. Так серин майже не поступається за швидкістю перенесення амінокислотного залишку з аміноациладенилат на  $\text{tRNA}^{\text{Thr}}$  від гомологічного треоніну. Відмінності в ефективності зв'язування серина і треоніну дають загальну різницю в швидкості активації порядку 103 [37]. Редагування серина ThrRS як пре-трансферним, так і по пост-трансферним шляхами, залежно від наявності  $\text{tRNA}^{\text{Thr}}$ . Гідроліз Ser-AMP за рахунок тРНК-незалежного пре-трансферного редагування йде в 29 разів швидше, ніж для треонін-аденилату, та в 40 разів

швидше спонтанного гідролізу. Але при наявності  $tRNA^{Thr}$  в достатній концентрації цей шлях поступається пост-трансферному [38].

У пост-трансферне редагування залучений N-кінцевий домен ThrRS [35]. Редагувальний домен, присутній у бактерій і еукаріот, відрізняється від ThrRS архей. Він гомологічний редагуючому домену аланіл-тРНК синтетази (AlaRS), в той час як археобактеріальний редагувальний домен структурно більш схожий на деацилази D-амінокислот [39]. Незважаючи на гомологію первинної структури, механізми редагування різні для бактеріальних ThrRS і AlaRS [40]. Перенесення амінокислотного залишку з аміноацилювального активного центру в редагувальний здійснюється за рахунок зміни конформації ССА-кінця тРНК [36]. Треонін не потрапляє в редагувальний активний центр первинної шляхом стеричного виключення метильної групи, а вуглець карбоксильної групи залишку серину піддається нуклеофільній атаці скоординованою молекули води (рис. 1.7) [41].

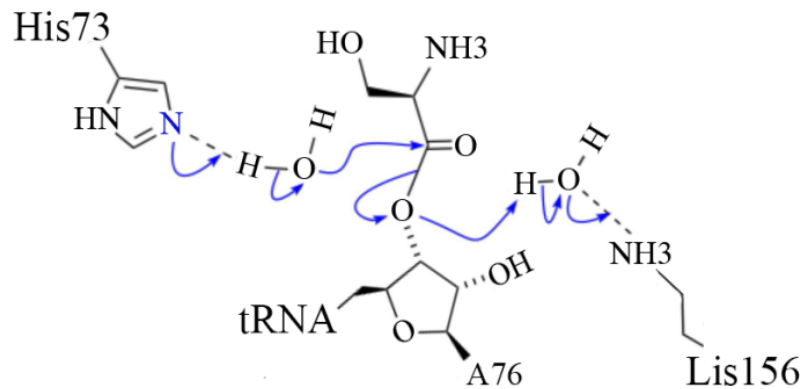


Рис. 1.7. Запропонований двоцентровий механізм гідролізу молекули Ser- $tRNA^{Thr}$  в редагувальному сайті ThrRS із *E. coli* [41]

Друга молекула води, також скоординована в редагувальному активному центрі і передає протон 3'-кисню до A76 із  $tRNA^{Thr}$ . Протон атакуючої молекули води стабілізується залишком гістидину, а гідроксильна група молекули субстрату - сольовим містком із залишком аспарагінової кислоти [41]. Нещодавно з використанням молекулярної динаміки (МД) та

квантово-механічних рохрахунків (QM/MM) був запропонований альтернативний механізм пост-трансферного редагування для ThrRS *E.coli*. А саме, на фоні протонуваних His73 та His186 депротонуваний Cys182 виступає в ролі основи. [42]

Закристалізовані аналоги обох аміноациладенилатів відобразили істотні відмінності як у конформації білка і ліганда, так і в розташуванні скоординованої води. У разі Ser-AMP, вода скоординована амінокислотними залишками Lys273 і, опосередковано, Tyr109, знаходилась під оптимальним кутом для нуклеофільної атаки. У разі аналога Thr-AMP найближча молекула води виявляється пов'язаною з атомом кисню сульфамойльної групи, і зорієнтована неоптимальним чином для нуклеофільної атаки [43].

### 1.2.3. Будова аміноацилювального сайту на прикладі LeuRS.

Основними елементами вторинної структури будь-якої молекули білка є спіральні ділянки, або  $\alpha$ -спіралі, а також плоскі тяжі, які називаються  $\beta$ -структурами. Шість паралельних  $\beta$ -тяжів та  $\alpha$ -спіральні ділянки структури Россмана нагадують віяло. Подібні структури виявлено в деяких інших ферментах, що зв'язують нуклеотиди, наприклад НАДН-кофактор дегідрогеназ або АТФ-субстрат різних протеїнкіназ, які переносять фосфатну групу АТФ на молекули білків або нуклеїнових кислот. Показано, що пептидні мотиви, характерні для АРСаз I-го класу, розташовуються саме в цьому місці і утворюють частину АТФ-зв'язуючого центру, причому позитивно заряджені залишки гістидину консервативного тетрапептиду HIGH взаємодіють із фосфатними групами АТФ. На рис. 1.8 показано аміноацилювальний сайт еубактеріальної та архельної синтетази I класу.

Для АРСаз II-го класу характерна зовсім інша структура активного центру: це сім антипаралельних  $\beta$ -тяжів. Характерні пептидні мотиви також локалізовані в складі цієї структури, і консервативний залишок аргініну другого мотиву бере участь у зв'язуванні АТФ

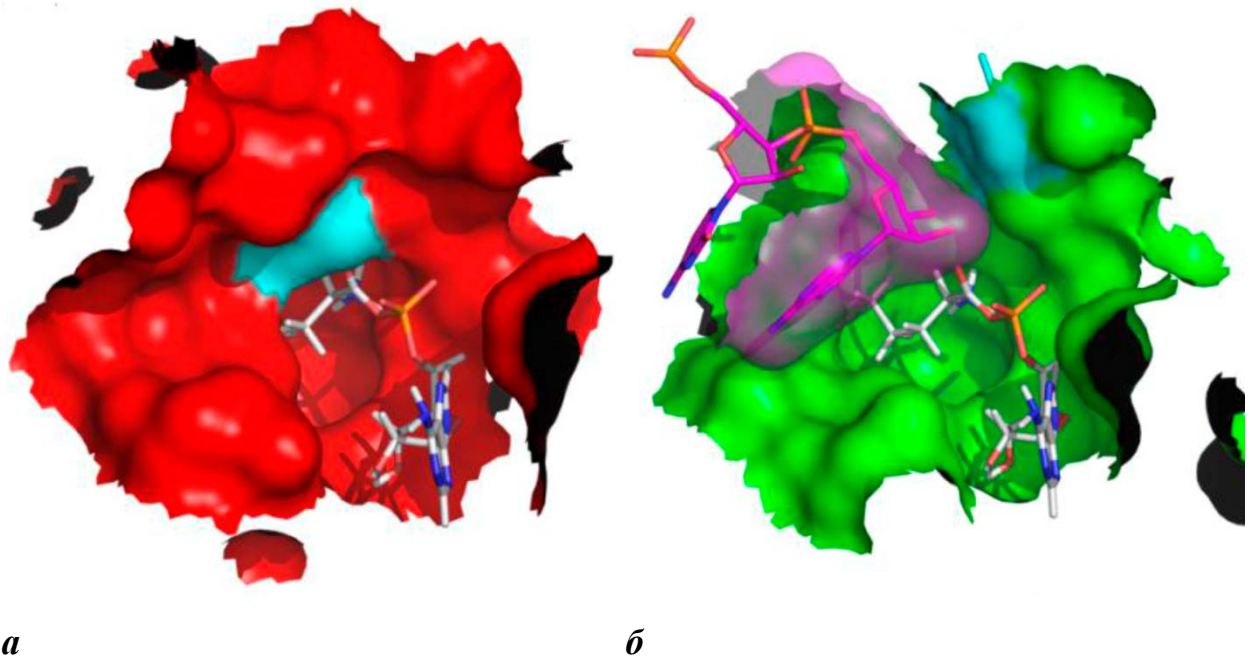


Рис. 1.8. Організація аміноацилювального сайту LeuRS із *T. thermophilus* (а) та *P. horikoshii* (б). Амінокислотний склад досить схожий, проте в археальній синтетазі передню стінку сайту формує 3'-кінець тРНК

. Таким чином, дані рентгеноструктурного аналізу підтверджують, що послідовності, на яких спочатку була заснована класифікація АРСаз, не є випадковими, а входять до складу активного центру ферментів і безпосередньо беруть участь у зв'язуванні одного з субстратів (АТФ). При цьому для зв'язування одного і того ж субстрату АРСазі різних класів використовують по-різному організовані домени, що може вказувати на надзвичайно ранній еволюційний поділ цих ферментів на два різних класи або навіть на їхнє незалежне походження [10, 44].

#### 1.2.4. Елементи будови редагувального сайту на прикладі LeuRS.

СР1 домен виконує функцію редагування неправильно активованих амінокислот та аміноацильованих тРНК і є відособленою та відносно рухливою структурою (рис. 1.9) [25]. Розглянемо його більш детально. Існують дві універсальні консервативні ділянки редагувального сайту:

треонін-збагачений пептид (залишки 247-252) та ділянка 327-347, що включає надзвичайно консервативну петлю 333-GT/SG та Asp347. Пуринова складова аденіна формує стекінгову взаємодію із Ile337 (або валін, у випадку IleRS, ValRS) та водневій зв'язки із амінокислотами завдяки положенням N1 та N6, звичайний тип впізнавання основи (наприклад, у аміноацилювальному сайті синтетаз класу I) [45, 46]. Надзвичайно консервативний мотив GT/SG необхідний для стабілізації конформації аденін-зв'язуючої петлі, обидва гліцини, що мають торсійні кути Phi/Psi, неможливі для інших залишків, а також знижують стеричні перешкоди через відсутність радикалів.

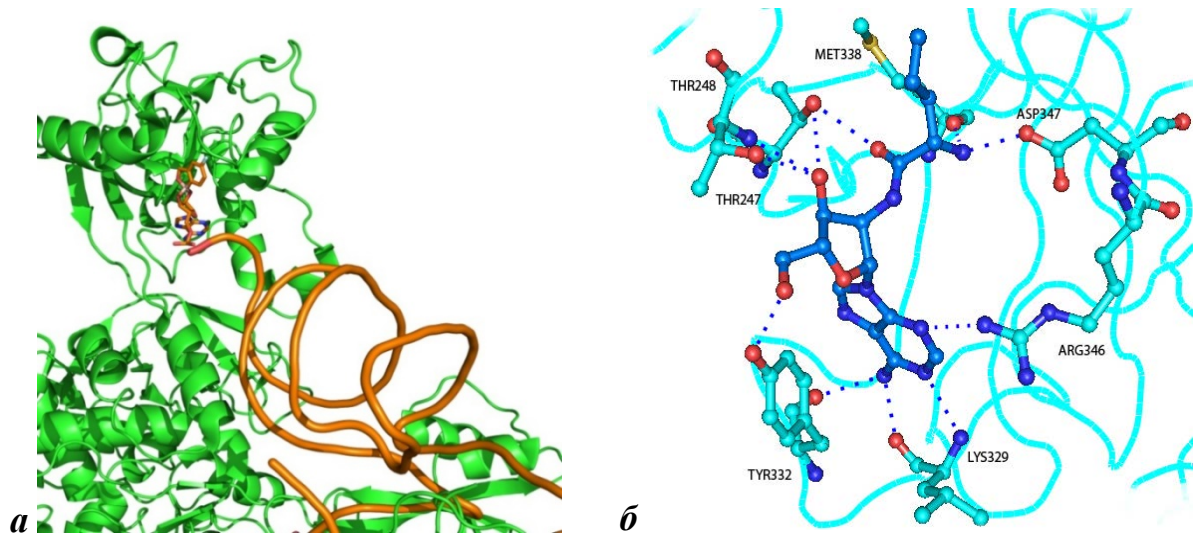


Рис. 1.9. Структура CP1 домену *LeuRS*. Структура CP1 домену із аміноацил-тРНК, що з'єднаний із каталітичною субодиницею за допомогою дволанцюгового лінкера  $\beta$ -складчастої природи (а). Аналіз кристалічних структур редагувальних доменів у комплексі із аналогом пост-трансферного редагування (б)

Основні деталі взаємодії Nva-AMS (пре-трансферний амідний аналог) із залишками редагувального сайту показані на рис. 1.9. Радикал норваліна занурений у великий гідрофобний карман, утворений Met338, Val340, Thr252 та аліфатичною частиною Arg249. Альфа-аміногрупа норваліну утворює водневий зв'язок із карбоксильною групою Asp347 та киснем Met338.

Важливо, що Thr252 є критичним для дискримінації гомологічних амінокислот [47]. Наприклад, заміна його на аланін послаблює специфічності редагувального сайту та робить можливим гідроліз Leu-tRNA<sup>Leu</sup>, що за нормальних умов звичайно не відбувається.

Треонін-збагачена ділянка грає важливу, але іншу роль у зв'язуванні аміноацилу. Гідроксил Thr247 (надзвичайно консервативний треонін) утворює водневий зв'язок із карбонільним киснем норваліну, а обидва Thr247 та Thr248 (менш консервативний) здатні формувати цілих три водневі зв'язки із 3'ОН групою рибози. Неконсервативний Asp344 приймає пряму участь в зв'язуванні субстрату. Радикал Tyr332 взаємодіє з основою пурину з протилежної сторони від Pe337. Гідроксильна група Tyr332 зв'язується із O5' аміноацилу і здатна також взаємодіяти із фосфатом кінцевого аденозину тРНК (A76) у повноцінному комплексі із тРНК. При порівнянні із редагувальним доменом ValRS із *T. thermophilus* [12], можна побачити велику схожість. Структура комплексу ValRS також показала, що передостанні основи, C75 і C74 tRNA<sup>Val</sup> не встановлюють контакти з областю редагування, а це означає, що Nva-аміноацил сам по собі володіє достатньою афінністю. Необхідно відмітити, що для цього комплексу необхідна велика кількість впорядкованої води.

**1.2.5. Редагувальний домен із проліл-тРНК синтетази *E. faecalis*.** Для порівняння редагувального механізму розглянемо структуру Проліл-тРНК синтетази (ProRS) із організму *E. faecalis*, якій теж властиве як пре-трансферне редагування проти аланіна, що відбувається в аміноацилювальному активному центрі, так і пост-трансферне редагування, яке відбувається в редагувальному INS-доміні [48, 49].

ProRS відноситься до підкласу А другого структурного класу, і являє собою гомодимер, мономер якого складається з двох основних доменів - аміноацилювального і С-кінцевого антикодон-зв'язуючого, характерного для APC цього підкласу. У архей і еукаріот також є антикодон-зв'язуючий

додатковий С-кінцевий домен. Для еукаріот характерні і N-кінцеві подовження різної природи [50]. У бактеріальних ProRS між другим і третім консервативними характерними мотивами 2-го структурного класу в первинну структуру аміноацилювального домену вставлена послідовність редагувального INS (insertion) домену (рис. 1.10) [48].

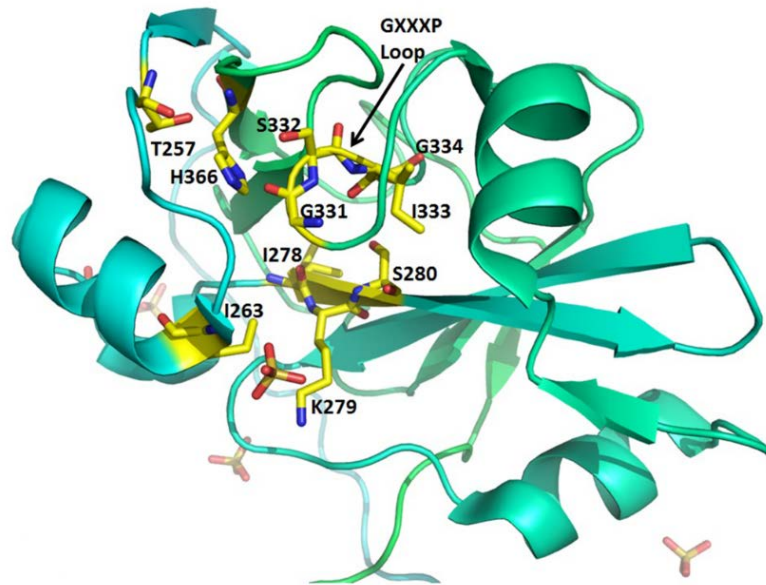


Рис. 1.10. Редагувальний домен ProRSEf. Позначені амінокислотні залишки, що беруть участь у зв'язуванні субстрату

Виняток становлять  $\alpha$ -протеобактеріальні і мітохондріальні ProRS, у яких редагувальний домен практично повністю делетований. Крім того, у багатьох бактерій, що відносяться до різних таксонів, типова бактеріальна ProRS замінена гомологічними архейними і еукаріотичними ферментами.

Існування ProRS, що не мають редагуючого домену, у архей, еукаріот і частини бактерій [50], як і існування окремих структурних одиниць - деацилаз, гомологів редагувального INS-домену, можна розглядати як ознаку відносно ранньої появи і високого, в минулому, значення пре-трансферного редагування.



### 1.3. Методи дослідження функціональних особливостей структури синтетаз та механізмів реакцій редагування

Молекулярна динаміка — це відносно новий, важливий метод, створений для дослідження динаміки біомолекул та механізмів їхнього функціонування. На разі основним експериментальним методом для визначення структури білків є рентгеноструктурний аналіз закристалізованих молекул. Проте, він дає лише одну статичну структуру функціонального стану молекули. В свою чергу, ядерно магнітний резонанс став важливим методом для дослідження структури білків, даючи уявлення про гнучкість молекул, показуючи ансамблі конформацій. Але цей метод має обмеження для великих білкових комплексів.

Таким чином, завжди була потреба в інструментах, які б дозволили зрозуміти поведінку біологічних мішеней та специфіку зв'язування лігандів. Молекулярна динаміка (МД), може використовувати отримані експериментально структурні дані для дослідження можливих конформацій біомолекул та різних шляхів взаємодій між собою [51, 52]. Отримання атомних зарядів та створення бібліотеки силового поля для нової молекули є ключовим етапом під час підготовки до проведення молекулярної динаміки та подальшого аналізу на основі структурних даних та енергії.

**1.3.1. Принципи молекулярної механіки.** Алгоритм обчислень у програмах для розрахунків молекулярної динаміки зводиться до ітераційного процесу, на кожному кроці якого:

1. За даним набором координат матеріальних точок (ядер атомів) обчислюються значення сил, наприклад, кулонівські, валентні й інші.
2. Далі обчислюються значення прискорень для кожного центра, у відповідності зі значенням діючої результуючої сили й маси цього центра.



3. Потім вирішуються рівняння руху в припущенні, що сили й прискорення не змінюються в часі. Координати центрів системи для якогось, як правило, дуже незначного, часу  $t$  записуються в пам'ять. Цей час називається *кроком інтегрування*. Нові координати й швидкості передаються на наступний крок.

Така механістична модель далека від ідеалу, але вона досить адекватно описує рухи молекулярних структур, якщо досить точно обчислено силові константи, а крок інтегрування не занадто великий.

У класичній механіці стан системи (найбільш повна інформація про систему) з  $N$  часток (атомів) у момент часу  $t$  однозначно визначається завданням набору векторів координат і швидкостей часток. Позначимо коротко ці набори  $x = \{x_i(t)\}$  і  $\{v_i(t)\}$ , які складаються з  $3N$  чисел (кожний вектор має 3 компоненти). Основне завдання механіки полягає в тому, щоб знайти та описати стан системи у довільний момент часу  $t$ , якщо відомий стан системи в початковий момент часу (при  $t=0$ ). У класичній механіці це завдання вирішується шляхом обчислення траєкторії руху  $x(t)$ . А траєкторія, в свою чергу, визначається шляхом рішення рівнянь руху. \*ссс

У методі молекулярної динаміки перше принципове питання складається в способі завдання значення *потенційної енергії, що залежить від взаємного розташування всіх атомів (енергетичний мінімум)*. Друге принципове питання — це спосіб рішення системи рівнянь руху. Навіть для невеликого білку число рівнянь становить приблизно 10000. Основа алгоритму полягає в наступному. Задавши координати й швидкості всіх часток у початковий момент часу, обчислюють на кожному наступному кроці всі сили й нові координати і швидкості часток. Найчастіше використовують «фізіологічно правильні» розрахунки, які проводять при постійній температурі або тиску. Для цього при комп'ютерному моделюванні застосовують баро/термостати (спеціальні алгоритми, які працюють при

додатковому контролю розподілу енергії за ступенями свободи). Зазвичай це термостат Берендсена, досить неточний алгоритм для погано врівноважених систем, та його більш точний термостат із стохастичним нарощуванням кінетичної енергії (*v-rescale*). Щодо баростату, то тут залежить від типу системи, в конкретному випадку, що обговорюється – баростат Парінелло-Рахмана.

Таким чином, у систему вноситься тепловий шум, наближуючи розподіл швидкостей до нормального Максвелівського розподілу при заданій температурі. Баростат змінює об'єм боксу для створення тиску, який дорівнюватиме заданому.

Ван-дер-Ваальсові взаємодії атомів, розділених трьома й більше валентними зв'язками, описуються потенціалами Леннарда-Джонса, а електростатичні взаємодії задаються кулонівським потенціалом. Водневі зв'язки виникають і зникають у процесі руху атомів між тими з них, які мають відповідний статус. Такий зв'язок не є у строгому розумінні валентним, але він утворюється за рахунок часткового перекривання електронних орбіталей двох атомів, що належать різним молекулам. Одним з таких атомів завжди виступає водень, який приєднаний до електронегативного атома — кисню або азоту — і має великий позитивний (частковий) електричний заряд. Звідси і назва «водневий зв'язок». Водень є акцептором електронів іншого атома, з яким виникає водневий зв'язок, — сильно негативно зарядженого атома кисню або азоту в певному валентному стані. Водневий зв'язок апроксимується потенціалом Леннарда-Джонса 10-12 або 8-10. Відзначимо, що система потенціалів (4)-(10) — досить наближений спосіб завдання потенційної енергії. Його недоліки полягають у тому, що енергія взаємодії представляється у вигляді суми парних сферично симетричних взаємодій. І те й інше, взагалі, невірно, але із цим доводиться поки миритися.

У молекулах орбіти валентних електронів зміщені відносно центра хімічних зв'язків через різну електронегативність хімічних елементів.

Електрони мають різну ймовірність знаходження поблизу валентно зв'язаних атомів, що в класичній молекулярній динаміці враховується за допомогою часткових зарядів на атомах. Ці заряди не кратні заряду електрона, як на іонах. Наприклад, в моделі молекули води TIP3P частковий заряд атома кисню дорівнює  $-0,834$ , а заряди кожного з атомів водню —  $+0,417$  [53]. Енергія водневого зв'язку приблизно на порядок менша енергії ковалентних зв'язків, але відіграє важливу роль в біології.

**1.3.2. Квантово-механічні розрахунки.** Обрахунки зарядів RESP для набору залишків представляє собою складну процедуру, яка залежить від безлічі вхідних параметрів. Для подолання цих проблем існує інструмент R.E.D. Tools (RESP and ESP charge Derive) [54]. Існує безліч різних підходів (методів) розподілення та розрахунку атомних зарядів: Маллікен (в оточенні полярного розчинника) і Льовдін (популяційний аналіз), теорія атома в молекулі, емпіричні підходи до відтворення кристалографічних або експериментальних даних, отримання парціальних зарядів (ESP) використовуючи напів-емпіричні або *ab initio* методи, AM1-BCC підхід. MEP розраховується для великої кількості точок на тривимірній поверхні навколо молекули. Наприклад, поле Amber використовує атомні заряди виходячи з інформації про точки на поверхні Connolly. Як відомо, система ESP зарядів найкраще підходить для роботи з міжмолекулярними властивостями, що вкрай необхідно для моделювання конденсованих фаз, де взаємодії типу розчинена речовина/розчинник та розчинник/розчинник повинні бути правильно визначені та збалансовані. Але все замикається на молекулярній конформації та орієнтації речовини. Початковий стан є визначальним для точності розрахунків. Природа цієї умови полягає в тому, що MEP точки мають знаходитися за межами ван-дер-Ваальсової поверхні молекули. Таким чином, атом вуглецю, що оточений водневими групами, матиме недостатню кількість точок, необхідних для характеристики центра. Через статистичну природу

процесу підбору зарядів подібна нестача інформації щодо центрів призводять до ряду артефактів, що виражаються у конформаційній енергії, великих значеннях зарядів і варіабельності орієнтацій чи конформацій речовини [55]. Рейнольдс запропонував метод отримання загального значення ESP зарядів базуючись на певному діапазоні конформацій. В свою чергу, Кольман використовував певні гіперболічні обмеження, щоб мінімізувати вплив ESP зарядів на підгонку, що представляє собою модель обмеженого ESP (або RESP). Саме використання кількох конформацій для підгонки зарядів за моделлю неполяризованих "RESP" зарядів призвело до розвитку силового поля Amber і стало особливо зручним при молекулярній динаміці конденсованих фаз.

Вибір базису для *ab initio* розрахунку MEP є ключовим аспектом у отриманні RESP і ESP заряду. Значення ESP зарядів сильно залежали від типу базису у випадку використання низько-рівневої теорії.

Зазвичай для отримання RESP і ESP зарядів атомів нової молекули необхідно зробити наступне. По-перше, геометрія молекули має бути оптимізована, а потім необхідно обчислити MEP навколо оптимізованої геометрії. Обидва кроки виконуються з використанням квантово-механічних методів. У результаті, парціальні заряди підганяються у відповідності до MEP, розрахованому на попередньому етапі. Для цього процесу було розроблено низку програм типу RESP і FITCHARGE. Для отримання конформацій можна використовувати Gaussian, GAMESS-US (General Atomic and Molecular Electronic Structure System), PC-GAMESS/Firefly і NWChem, які мають аналогічні функціональні можливості гаусової програми. Проте для великого набору молекул зручніше та швидше використовувати Antechamber із пакету AmberTools, але вона здатна обробляти та отримувати заряди тільки для окремих органічних речовин/лігандів, а не для молекулярних фрагментів. Завдяки цим програмам можна отримати бібліотеку речовин, необхідну для запуску молекулярної динаміки.

Отже, використовуючи ряд методів з моделювання біологічних об'єктів можливе визначення видоспецифічності механізму або структури синтетази, що в свою чергу дозволить створювати лікарські засоби проти патогенів різної природи. Спільна для кожного класу архітектура АРСаз, набуває різноманітних структурних доповнень, відмежовуючи навіть види один від одного. Це дає можливість дуже вибірково впливати на життєдіяльність певних організмів при доскональному розумінні всіх етапів роботи його АРСаз.

Саме таким чином було вивчено та використано дані щодо механізму селективності, притаманного ThrRS, який став першим добре поясненим прикладом функціонування реагуючої системи, як з точки зору біохімії, так і залученням розрахункових методів.

Зрозуміло, що особливість LeuRS полягає в тому, що вона має відрізнити свою амінокислоту від іншої, а цього в свою чергу важко досягти у випадку із аліфатичними чи гідрофобними залишками. До того ж норвалін відноситься до амінокислот не білкової природи. Саме тому в процесі еволюції також з'являлись нові способи додаткового захисту від помилок. І саме тому ця синтетаза є дуже вдалим об'єктом для досліджень. На противагу пролінова система досить цікава з точки зору валідації методу дослідження на зовсім відмінній системі.

Основним завданням цього дослідження було вивчення механізмів редагування і передбачення положення субстрату в сайті редагувального домену (CP1 / Inst) повнорозмірної молекули синтетази із тРНК.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Пошук гомологів та структурних доменів з подібною амінокислотною послідовністю

При аналізі баз даних було визначено ряд структур, що задовольняють нашим задачам. Так для лейцинової системи еубактеріального типу використовувалися 4 кристалічні структури [2V0G, 1OVC, 1OVH, 2VTE], для археального лише дві за доступних [1WZ2, 1WKB], а при вивченні пролінової системи – лише одна структура [2J3M].

Для початку роботи із вивчення структурних особливостей та деталей взаємодій між лігандами та ферментом необхідно провести певну роботу з доопрацювання структур. Рухливість певних елементів вторинної структури як то петля тРНК (2V0G) чи послідовність неструктурованих амінокислот (1WZ2) позначається на цілісності 3D моделей. Для забудови відсутніх ділянок необхідно визначити шаблонну модель, відповідно до якої буде проводитись реконструкція.

Для подібної роботи повністю підходить он-лайн інструмент BLAST, алгоритм "Smith-Waterman" якого був спеціально розроблений для пошуку послідовностей за гомологією [58]. Після отримання послідовності з бази даних UniProt використовувався BLAST, у результаті чого, базуючись на значенні e-value, можна робити висновки щодо ступеня гомології між порівнюваними об'єктами.

Усі роботи щодо використання результатів аналізу послідовностей, відбудови делецій або зміни конформацій (для тРНК із структури 2V0G

положення тРНК 16-17 та 33-37 та для пептидної частини комплексу 1WZ2 (положення 357-372), проводилися за допомогою скриптів програмного пакету Modeller 9v7. Модифікацію та транслокація акцепторного стебла тРНК із *P. horikoshii* та *E. faecalis* було зроблено із залученням 3DNA серверу [59].

## 2.2. Підготовка неканонічних органічних структур

Структури субстратів будувалися в середовищі програми Marvin Sketch. Було побудовано 8 амінокислот (ізолейцин, лейцин, норвалін, цистеїн, гомоцистеїн, метіонін, норлейцин, валін) із властивостями  $\text{COO}^-/\text{NH}_3^+$ ; 8 аміноациладенілатів, утворених із аденозиномнофосфату (AMP) та, власне, амінокислот. Топології для індивідуальних амінокислотних залишків були включені в бібліотеки силового поля amber99. Для параметризації цвіттеріонів аміноациладенілатів ми використали програму Antechamber із пакету AmberTools [60].

Було створено ряд моделей амінокислот із приєднаною групою до карбоксильного кисню, наприклад метильною  $\text{NH}_3\text{CRCO-OCH}_3$ . Отримавши структури після редактора, необхідно було створити вхідні файли для квантово-механічного розрахунку. Для цього використали утиліту Babel. У результаті було відібрано по три конформації для обох молекул аміноацил-тРНК та 8 аміноациладенілатів і 8 амінокислот у форматі PDB (Protein Data Bank).

Окремо проводилась підготовка структур молекул аміноацил-тРНК (Nva-/Pse- із кінцевим аденозином тРНК) зі заміною частин молекул на групи-замісники для отримання топологій аденілатів та аміноацилів за методом одержання RESP зарядів. Користуючись посібником (R.E.D. Server: Examples & demonstration Execution of the Ante\_R.E.D. 2.0 and R.E.D. IV programs) за допомогою програми Ante\_R.E.D було перетворено PDB файли у відповідні файли P2N (рис. 2.1). Для кожної молекули в форматі P2N, визначали ім'я

(IUPAC) і додавали в поле REMARK TITLE. Ця назва потім використовувалась в GAMESS- і RESP-файлах під час процедури підгонки заряду. При заданій конформаційній рухливості молекули файл складався із трьох молекул, розділених TER-дискримінатором. Для кожного набору координат були введені окремі ремарки та опції.

Загальне значення заряду виставили на 1.0 (REMARK CHARGE-VALUE 1), значення мультиплетності 1 (REMARK MULTIPLICITY-VALUE 1), що є звичайним для органічних молекул. Розподіл заряду корегувався за допомогою внутрішньо та міжмолекулярних примусів (INTER-MCC and INTRA-MCC) Переорієнтація молекули при підгонці зарядів використовувалась за замовчуванням і передбачала два варіанти.



Рис. 2.1. Загальний принцип підготовки топологій за допомогою R.E.D.III, починаючи з файлу координат

Для відповідності принципам силового поля Amber ми використали внутрішньомолекулярні обмеження заряду типу «REMARK INTRA-MCC - .3081 | 9 10 11 12 13 | R» (R означає, що фрагмент, для якого створені обмеження, буде видалено із структури молекули, вказані цифри відповідали нумерації атомів –OCH<sub>3</sub> групи). Таким чином –OCH<sub>3</sub> група отримала вимушене обмеження на заряд –0.3081, а при сумарному заряді молекули +1 NH<sub>3</sub>CRCO-група отримала в результаті обробки заряд +1.3081.

У результаті: RA3 (3'-кінцевий аденозин) перетворювався на RA (із сумарним зарядом –1), а амінокислота, що додавалась до РНК-ланцюга отримувала заряд +1.3081, що разом із 5'-кінцевим нуклеотидом (заряд



-0.3081) склало б сумарний цілий заряд і загальний заряд молекули РНК+аа зменшився б на 1.

Опція OPT\_Calc \$ = "Off" була вибрана тому, що оптимізація геометрії для кожної із молекул (а також для різних конформацій кожної молекули) виконувалась окремо в пакеті GAMESS.

Отримані дані для кожного із субстратів зберігались у форматі mol2. За допомогою команд модуля tLEaP окремі фрагменти (амінокислота із новими параметрами та РНК) були об'єднані в єдиний файл зі спільною топологією.

Перенумерацію атомів і амінокислот у правильному порядку та заміни були зроблені за допомогою скриптів Python 3.4.

### 2.3. Параметризація молекулярної динаміки

У програмі PyMol було зроблено 8 окремих моделей для подальшої роботи: 2 повні структури LeuRS з *T. thermophilus* та *P. horikoshii* у комплексі із тРНК (967 та 876 залишки); два обрізаних активних центра (813 та 804 залишки). Для проведення релаксації використовувався програмний пакет GROMACS 4.5 та силове поле Amber99p [61, 62] Силове поле Amber, так як і Charmm27, є повноатомним силовим полем і було розроблене для моделювання білків та нуклеїнових кислот.

Приклад файлу параметрів для вільної 5нс молекулярної динаміки після проходження етапів мінімізації енергії за алгоритмами «швидкого спуску», «сполучених градієнтів» та врівноваження системи (табл. 2.1).

Особливості будови аміноацилювального сайту архейної LeuRS та INS домену бактеріальної ProRS змусили використати додаткові параметри. Так як аміноацилювальний сайт значно перевищує розміри субстрату, а ССА'-кінець тРНК формує певні стеричні умови для перенесення амінокислоти з аденілату на тРНК, необхідно було зафіксувати відокремлений ССА'-кінець на поверхні каталітичного домену. Для цього на перших 30 нс використовувалась опція

COM PULLING. Завдяки даним параметрам ССА'-кінець не відривався від молекули протеїну під час динаміки та не руйнував активний сайт.

Таблиця 2.1

### Параметри молекулярної динаміки

Параметр	Значення	Параметр	Значення
constraints	all-bonds	rwdw	1.1
Integrator	md	fourierspacing	0.12
Tinit	0.0	box	octhaedron
dt	0.002	Tcoupl	v-rescale
nsteps	2500000	tau_t	0.1 0.1 0.1
nstcomm	1	tc-grps	protein non-protein rna
nstxout	100	ref_t	333 333 333
nstvout	0	Pcoupl	Berendsen/Parrinello-Rahman
nstfout	0	pcoupltype	isotropic
nstlist	5	tau_p	0.5
ns_type	grid	compressibility	4.5e-5
pbc	xyz	ref_p	1.0
rlist	1.1	gen_vel	yes
rcoulomb	1.1	gen_temp	333.0

#### 2.4. Аналіз траєкторії молекулярної динаміки

Для отримання інформації щодо поведінки лігандів та амінокислот сайту в процесі молекулярної динаміки необхідно проаналізувати вихідні \*.trr- та \*.edr-файли. Для цього існує великий арсенал різних програм з пакету Gromacs. У нашому випадку ми використовували ті, що можуть бути пов'язані із описом енергії, чи стабільності елементів.

*g\_rms* — отримує інформацію з файлу траєкторії та, базуючись на змінах координат, обчислює середньоквадратичне відхилення між структурами після

найменших квадратів, порівнюючи із референтним станом. Це дуже зручно для швидкого та якісного аналізу поведінки структури в цілому або окремої її частини (за допомогою `index.ndx`-файла), а також особливо ефективно для дослідження стабільності/рухливості структури ліганду. На графіках зображено дві осі: вісь ординат показує відстань в ангстремах, а вісь абсцис відповідає часовому проміжку в пікосекундах. Зазвичай, спостерігається широка смуга, сформована із точок на відстані в декілька десятих ангстрема одна від одної.

*g\_energy* — аналізує інформацію з `*.edr`-файлу і виводить результат у вигляді `*.xvg`-файлу для побудови діаграм та аналізу. Вісь ординат графіку відповідає енергії в даний момент часу в одиницях кДж/моль. Для аналізу взаємодій типу ліганд-протеїн ми використовували дані Леннард-Джонса та Кулонівської енергій. До того ж із усього списку варіантів було обрано SR ("short-range") взаємодію, яка відбувається в межах найкоротшої з відсічок.

*g\_hbond* — обчислює кількість водневих зв'язків між двома групами на основі простих геометричних критеріїв. Є досить важливим показником афінності ліганду по відношенню до рецептора. Проте в даній роботі результати не приводяться так, як були не досить показовими і використовувалися лише в якості проміжних під час підготовки та відбору.

*g\_rmsf* — обчислює середньоквадратичне коливання (RMSF, тобто стандартне відхилення) позицій атомів відносно (опціонально) початкових координат. Дає досить повну картину про стан системи впродовж динаміки.

Для обрахунків геометрій та розташування молекул воді було розроблено скрипт на мові Python (ver.3.4), що аналізував кожний фрейм молекулярної динаміки. Ідея його функціонування базувалась на відомих механізмах нуклеофільної атаки і необхідних умовах процесу. Перш за все, траєкторія МД була оброблена за допомогою вбудованих інструментів Gromacs для опису ліганду, всіх навколишніх амінокислотних залишків і тих молекул води, які знаходились на відстані 3.5Å принаймні один раз протягом

МД. Потім вихідний файл траєкторії в форматі \*.pdb опрацьовувався із вилученням кожного кадру і ідентифікацією тих молекул води, які задовольняли умови відстані ( $<3.5\text{\AA}$ ) і наближеного значення кута Бургі-Дуніца ( $105-110^\circ$ ). Орієнтація молекули води відіграє важливу роль, тому вона була визначена шляхом порівняння трьох відстаней між карбонільним вуглецем ліганда і кожним атомом молекули води для впевненості в тому, що кисень води знаходиться ближче, ніж інші атоми.

У разі успіху попередніх кроків розпочинався пошук асистуючої молекули - шляхом оцінки відстаней і орієнтації між іншими молекулами води і атакуючою молекулою води. Якщо будь-яка молекула води була розташована на відстані  $<3.5\text{\AA}$  від атакуючої молекули води, простір навколо досліджувався для виявлення амінокислотних атомів, які могли б активувати або, принаймні, фіксувати асистуючу молекулу води. Всі отримані результати записувалися в список даних.

## 2.5. Гнучкий докінг молекули тРНК та лігандів

**2.5.1. Налаштування програми HADDOCK.** Одним з інструментів, що було залучено для досліджень, став макромолекулярний докінг. Власне ми робили редокінг та докінг молекул тРНК на поверхню АРСаз.

Обмеження були визначені на основі порівняння подібних структур. Фактично, було виділено ряд «активних» і «пасивних» залишків. «Активні» — це залишки молекули білка, а «пасивні» — залишки розчинника всіх доступних сусідів активних амінокислот. Так до активних була віднесена група залишків редагувального домену та активні амінокислоти, що можуть взаємодіяти із цукроофосфатним остовом або активними атомами основ.

Розрахунки поверхні, доступної для води (Solvent Accessible Surface Area) проводились за допомогою скрипту SASA, що входить до пакету VMD. Результати використовувались у розширених опціях під час докінгу. Одна з

головних переваг HADDOCK — це можливість дозволу гнучкості при стикуванні [63]. За замовчуванням HADDOCK2.0 призначить гнучкість залишкам автоматично під час гнучкої стадії стикування (nseg має значення -1). Проте, ми додатково визначили напівгнучкі сегментів двох ланцюгів тРНК: 12 основ 5'-кінця та 17 основ 3'-кінця. При цьому була зазначена взаємодія між ССА-кінцем тРНК та амінокислотами редагувального домену.

Для обмеження, що застосовувались відносно фрагменту тРНК, ми внесли зміни у \*.cns файл:

*Base-pair planarity: Default: false*

*Base planarity: Default: true*

*Backbone dihedral angles: Defaults: dna\_pick\_pucdih and dna\_pick\_bacdih true*

Стандартний набір параметрів енергії, який застосовується при білок-білковому докінгу, ми замінили на такий, що відповідав нашим потребам у випадку білок-нуклеїнового докінгу.

### **2.5.2. Використання FT-MAP серверу для оцінки якості докінгу.**

Прогнози результату HADDOCK були отримані ще до запуску і власне на них формувалися «обмеження/примушення» для докінга. 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 [64]. Також сервер FT-MAP використовувався при зондуванні обох сайтів археальної синтетази. Нижче описані принципи роботи серверу, що визначає можливі взаємодії між лігандом та білком.

Основні підходи: (А) Докінг потенційних лігандів і (Б) відображення ділянок зв'язування на поверхні білка за допомогою молекулярних зондів — невеликі молекули і функціональні групи. Алгоритм пошуку включає: 1) пошук твердого тіла для створення великої кількості можливих конформацій з високою комплементарністю і, можливо, непоганими значеннями

електростатики та десольватації; 2) уточнення (rescoring) і, можливо, фільтрація конформацій, використовуючи більш точні функції вільної енергії; 3) кластеризація залишившихся структур і ранжування кластерів на основі середньої вільної енергії. Цей алгоритм був офіційно реалізований для відображення карти білків з використанням органічних розчинників як зондів.

Розрахунки за цим алгоритмом передбачають переміщення молекулярних зондів по поверхні білка, пошук вигідних позиції, використовуючи емпіричні значення функцій обчислення вільної енергії, кластеризацію конформації і ранжування кластерів на основі середньої вільної енергії. Було показано, що такий підхід, як правило, набагато менш чутливий до конформаційних змін в структурі білка, ніж звичайний докінговий метод. У даному випадку використовувалось 4 із принаймні шести різних зондів, і, як наслідок, амінокислотні залишки, які взаємодіють із зондами, використовувались при налаштуванні докінгової програми.

**2.5.3. Молекулярний докінг у програмі GOLD.** Після отримання релаксованих структур та сукупності лігандів наступним кроком стала параметризація докінгового процесу. Задля цієї мети було задіяно програмне забезпечення Gold 5.0 CCDC [65]. Дана програма використовує генетичний алгоритм та дозволяє робити контрольну оцінку результату. Робочий об'єм сайту був визначений радіусом у  $10\text{\AA}$  навколо атома в глибині сайту. Даний вибір було зроблено на основі інформації про сайти після обробки структур на сервері FT-MAP. Автоматичне визначення та присвоєння типів атомів і типів зв'язків необхідно було корегувати вручну. Так, наприклад, фосфатна група аденілатів та АМР мала бути відредагована: типи атомів кисню були перейменовані на O.co2, а зв'язок із фосфатною групою став ароматичним.

Було призначено 100 GA запусків для кожного з лігандів. Розмір популяції для GA дорівнював 100, кількість операцій сягала 100000, тиск відбору було встановлено на 1.1, кількість островів — 5, розмір ніші — 2,

частота мутацій в різних експериментах — від 90 до 95, частота міграцій — 10. Інші параметри були призначені за замовчуванням.

Налаштування пошуку та оцінки проміжних результатів передбачали подвійний аналіз конформацій кожного з лігандів впродовж всіх 100 запусків. Кожна із оціночних функцій представляє собою суму енергій, внесок яких оцінюється окремо.

Першою оціночною функцією було обрано GoldScore, яка враховувала водневі зв'язки, ван-дер-ваальсові взаємодії та, головне, розміщення ліганду у середині сайту (стеричні умови). Власне функція GoldScore включає чотири компоненти:

- Енергія водневих зв'язків між ферментом та лігандом;
- Ван-дер-Ваальсова енергія взаємодії між ферментом та лігандом;
- Внутрішня Ван-дер-Ваальсова енергія (між частинами ліганду);
- Енергія обертання субструктур ліганда;

Додатково ми використовували п'ятий компонент — енергію внутрішньо-молекулярних водневих зв'язків. У випадку із аміноациладенілатами в редагувальному домені LeuRS із *P.horikoshii*, сайт якого не такий об'ємний як у LeuRS із *T.thermophilus*, для прискорення пошуку використовувалися дистанційні обмеження між  $\text{NH}_3$ -групою та  $\text{COOH}$ -групою Asp332 для зниження кількості неправильних. Параметри VdW та h-bonding відповідали 4.0 та 2.5, що забезпечувало більшу кількість початкових конформацій.

Далі відібрані конформації перевірялись за оцінкою функції ChemScore, яка включала в себе розрахунки вільної енергії лігандів на основі статистичних даних, кожна із складових якої може додатково розкладатися на окреме рівняння:

$$\Delta G_{binding} = \Delta G_0 + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{metal} + \Delta G_{lipo} + \Delta G_{rot}$$

$$\begin{aligned} \Delta G_0 &= \nu_0 & \nu & \text{— коефіцієнт регресії} \\ \Delta G_{hbond} &= \nu_1 * P_{hbond} & P & \text{— різні типи фізичних внесків:} \\ \Delta G_{metal} &= \nu_2 * P_{metal} & P_{hbond} & \text{— водневих зв'язків} \\ \Delta G_{lipo} &= \nu_3 * P_{lipo} & P_{metal} & \text{— металічних та координаційних зв'язків} \\ \Delta G_{rot} &= \nu_4 * P_{rot} & P_{lipo} & \text{— гідрофобних властивостей} \\ & & P_{rot} & \text{— внесок конформаційної рухливості} \end{aligned}$$

Остання оціночна функція ASP (Astex Statistical Potential) включала в себе порівняльний аналіз торсійних кутів, довжин зв'язків у отриманій конформації із власним набором елементів, що були розроблені на основі експериментальних даних. Ця оціночна функція відрізняється від інших статистичних потенціалів вибором так званого референтного стану. Цей «референтний стан» представляє собою очікуване число контактів за відсутності взаємодії між атомами (наприклад, на великих відстанях). Контакти між атомами, як правило, визначаються функцією радіального розподілу (RDF). Враховуючи атом у деякому положенні RDF покаже, як багато інших атоми, можна очікувати на відстані від  $r$  до  $r + dr$ , де  $dr$  — це розмір вибірки RDF і може розглядатися як «товщина» сферичної оболонки. Статистичний потенціал між двома типами атомів  $i$  та  $j$  визначається залежністю між отриманими ( $n_{obs}$ ) та експериментальними ( $n_{exp}$ ) результатами:

$$StatScore(i, j, r) = -\ln \frac{n_{obs}(i, j, r)}{n_{exp} StatScore(i, j, r)}$$

ASP відчутно точніший порівняно із ChemScore- та GoldScore- алгоритмами. Інформація про частоту взаємодій між атомами ліганда та протеїнів сформована на основі аналізу існуючих комплексів, доступних у RCSB базі. Ці дані і використовуються під час генерування потенціалу. При можливості програми використовувати лише дві функції одночасно ми



вирішили підключити аналог ChemScore-функції — Internal Energy Offset, який визначає внутрішню енергію на основі торсійних кутів, внутрішніх водневих зв'язків, внутрішніх VdW взаємодій. Цей параметр доступний лише якщо першою функцією стоїть GoldScore.

Ще один критерій, який використовувався в процесі пошуку — це diverse solution clustering із розміром кластеру, що дорівнював 1 та RMSD, відсічі для можливих конформацій у кластері, 1.5Å. Цей параметр фокусує функції генетичного алгоритму на групу конформацій із заданим критерієм розбіжності.

Рухливість ліганда залежала від таких компонентів, як: внутрішні водневі зв'язки, обертання (не переворот)  $-(O=C)-OH$ -групи, фліпів планарних R-NR1R2-елементів, а також кільця-NHR та кільця-NR1R2. Для оцінки результатів використовувалися значення оціночних функцій. Зазвичай, чим вище значення, тим краще, проте за будь-якої можливості необхідно проводити порівняння та валідацію метода, базуючись на кристалографічних даних.

## 2.6. Програмне та технічне забезпечення

Основним пакетом, що застосовувався для вивчення особливостей будови різних частин синтетаз, генерації поверхонь (Conolly, VdW) та підготовки малюнків був VMD. Здатність читати файли траєкторій дозволила відслідковувати структурні зміни лігандів та протейнів під час молекулярної динаміки. Для візуалізації структур під час пошуку ключових амінокислотних залишків використовувалась програма PyMol 1.4.

Розрахунки динаміки було проведено з використанням кластера Інституту молекулярної біології і генетики (ІМБГ) НАНУ. Він є одним із найпотужніших в Україні (360 процесорних ядер) після кластера Інституту кібернетики НАНУ (понад тисячу процесорних ядер), Національного

технічного університету України «КПІ» (620 процесорних ядер) та Інституту сцинтиляційних матеріалів НАНУ (416 процесорних ядер). Кластер ІМБГ побудовано на базі процесорів Intel, кожен обчислювальний вузол якого складається з 24 процесорних ядер. Для збереження траєкторій динаміки, які потребують великих об'ємів пам'яті, розроблено сховище розміром 8 Тб.

Використовуючи сервіси віртуальної лабораторії MolDynGrid [56, 57] розрахунки також проводились в грид-середовищі, використовуючи обчислювальні кластери Українського національного гриду. Зокрема було використано кластер Інституту кібернетики НАН України (кластер SCIT), Національного технічного університету України «КПІ» (кластер КРІ), Інституту молекулярної біології та генетики НАН України (кластер ІМБГ), Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України (кластер ISMA), Інституту фізики НАН України (кластер ІОР). Також використовувались обчислювальні ресурси Суперкомп'ютерного центру імені Лейбніца, Баварської академії наук (Німеччина), який через грид підключено до віртуальної лабораторії MolDynGrid.

## РОЗДІЛ 3

### ВИЗНАЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ ОСНОВ СПЕЦИФІЧНОСТІ LEURS ПО ВІДНОШЕННЮ ДО АМІНОКИСЛОТИ ТА МОЖЛИВИХ МЕХАНІЗМІВ ПРЕ-ТРАНСФЕРНОГО РЕДАГУВАННЯ

#### 3.1. Дослідження розташування амінокислот та АМР у аміноацилювальному сайті *LeuRStt*

Кристалічна структура LeuRS із *Thermus thermophiles* (*LeuRStt*) у комплексі із сульфамойл-аналогом лейцил-аденилату (Leu-AMS) показала структуру синтетичного сайту ферменту та деталі зв'язування субстрату [45]. Цікаво, що великої гідрофобної кишені для лейцину вистачає для розміщення амінокислот різного розміру. В біохімічних дослідженнях було показано, що, крім лейцину, LeuRS помилково активує ізолейцин, метіонін, норвалін, норлейцин та гомоцистеїн [26, 45, 46, 66]. Щоб уникнути помилок, LeuRS редагує обидва пре- та пост-трансферні субстрати, що було досліджено у багатьох лабораторіях [26, 27, 29, 45, 46, 66]. Незважаючи на інтенсивне вивчення, структурне підґрунття для розрізнення амінокислот та механізмів редагування LeuRS досі не зрозуміле. Особливо важливою є проблема дискримінації ізолейцину, який зазвичай використовується у біохімічних експериментах по редагуванню LeuRS [30, 67, 68].

Ми використовували *in silico* методи моделювання молекулярного докінгу та молекулярної динаміки (МД), щоб продемонструвати можливі механізми відбору амінокислот на етапі аміноацилювання у *LeuRStt*, дослідити деталі зв'язування пре-трансферних субстратів і можливі механізми їх гідролізу.

Для пошуку можливих положень амінокислот в синтетичному сайті *LeuRSTt* ми використовували молекулярний докінг. Після мапування поверхні (визначення стеричних умов) та визначення можливих водневих зв'язків ми виявили набір амінокислот та їх ротамерів, що можуть бути важливими для докінгу. Вісім комплексів, що включали *LeuRSTt*, АМР та амінокислот, 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. 3.1 представлені візуальні відмінності, в першу чергу, відстань між киснем карбоксилу амінокислот та фосфатною групою АМР, а також просторовою орієнтацією карбоксильних груп, що можна розглядати як передумови для утворення зв'язку.

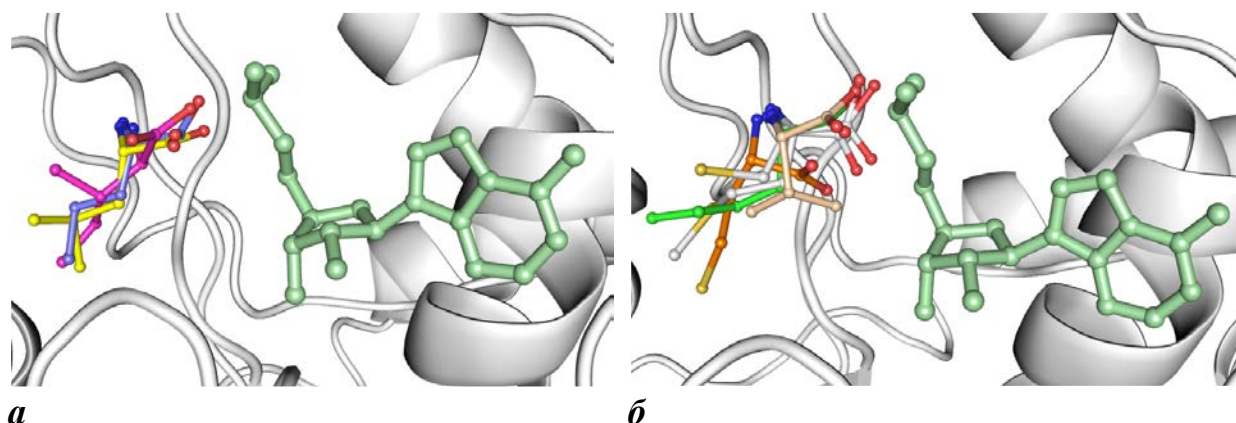


Рис. 3.1. Результати докінгу молекули лейцину (жовтий), норваліну (блакитний), ізолейцину (рожевий) (а) та ряду подібних амінокислот (б): валін (жовтий), цистеїн (білий), гомоцистеїн (сірий), метіонін (помаранчевий), норлейцин (зелений)

Таким чином, навіть ті орієнтації, які мали високі показники оціночних функцій, але не відповідали передбачуваній орієнтації, були відхилені. Також враховано водневі зв'язки між аміногрупою субстрату та карбоксильними групами Asp80 та Phe41. Важливою особливістю для АМР була просторова орієнтація пуринового кільця, що відіграє велику роль при стабілізації цього компонента у всіх комплексах. Оцінка конформації субстрату проводилась за

результатами подвійної оціночної функції (див. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ) (табл. 3.1 та 3.2).

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> Ile> Met> Ile [26, 46, 66], а у випадку LeuRS із термофільних бактерій *Aquifex aelicus*, в наступному порядку: Leu> Nva> Met> Ile [26].

Подальші дослідження проводилися із використанням молекулярної динаміки для кожного комплексу, що включав елементи активного сайту, амінокислоти та АМР.

Таблиця 3.1

**Результат докінгу амінокислот (aa) в аміноацилювальний сайт LeuRStt в присутності АМР**

<i>Субстрат</i>	<i>GScore</i>	<i>ASP</i>
Methionine	46.3	10.1
Cysteine	40.6	7.9
<b>Isoleucine</b>	<b>44.1</b>	<b>6.4</b>
Valine	37.8	5.3
<b>Leucine</b>	<b>56.7</b>	<b>22.3</b>
<b>Norvaline</b>	<b>52.2</b>	<b>15.3</b>
Hcysteyne	50.5	15.3
Norleucine	48.2	10.5

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). Як виявилось, найбільш значущі дані можна отримати лише для лейцину, ізолейцину та норваліну.

Усереднені тривимірні структури і орієнтації амінокислот у сайті, які відповідають геометрії із найбільшою частотою появи під час динаміки, представлені на рис. 3.2. Графіки з флуктуаціями енергії та рухливістю атомів не демонструють помітних відмінностей, чого було б достатньо для пояснення біохімічних експериментів. Причиною неможливості адекватного тлумачення та порівняння даних для валіну та цистеїну є невеликий розмір, що викликає підвищену мобільність. Власне, цистеїн із самого початку (докінгова конформація) знаходиться в невідповідному положенні і в процесі динаміки не втрачає зв'язку із синтетичним сайтом, проте віддаляється від АМР на протязі першої наносекунди. Незважаючи на надмірну гнучкість метіоніну, гомоцистеїну та норлейцину, показано, що ці амінокислоти можуть стати субстратами LeuRS. Це підтверджується тим, що відстань між аміногрупами лейцину, норваліну, гомоцистеїну та Asp80 була стабільною і достатньою для утворення водневих зв'язків та фіксації субстрату в кишені сайту. Таким чином, можна зробити висновок, що основним фактором, що впливає на швидкість активації амінокислот, є геометрія СОО-групи та її позиціонування по відношенню до фосфату АМР. Звичайно, таке порівняння має сенс лише для подібних амінокислот.

Щодо найкращої тріади амінокислот аналіз показав суттєві відмінності між норваліном та ізолейцином. Молекула лейцину була використана як референсний ліганд, оскільки вона є спорідненим субстратом аміноациювання. Графік RMSD (рис. 3.2) показує зміщення атомів ізолейцину та підтверджує відмінний рівень стабільності ліганда у сайті зв'язування.

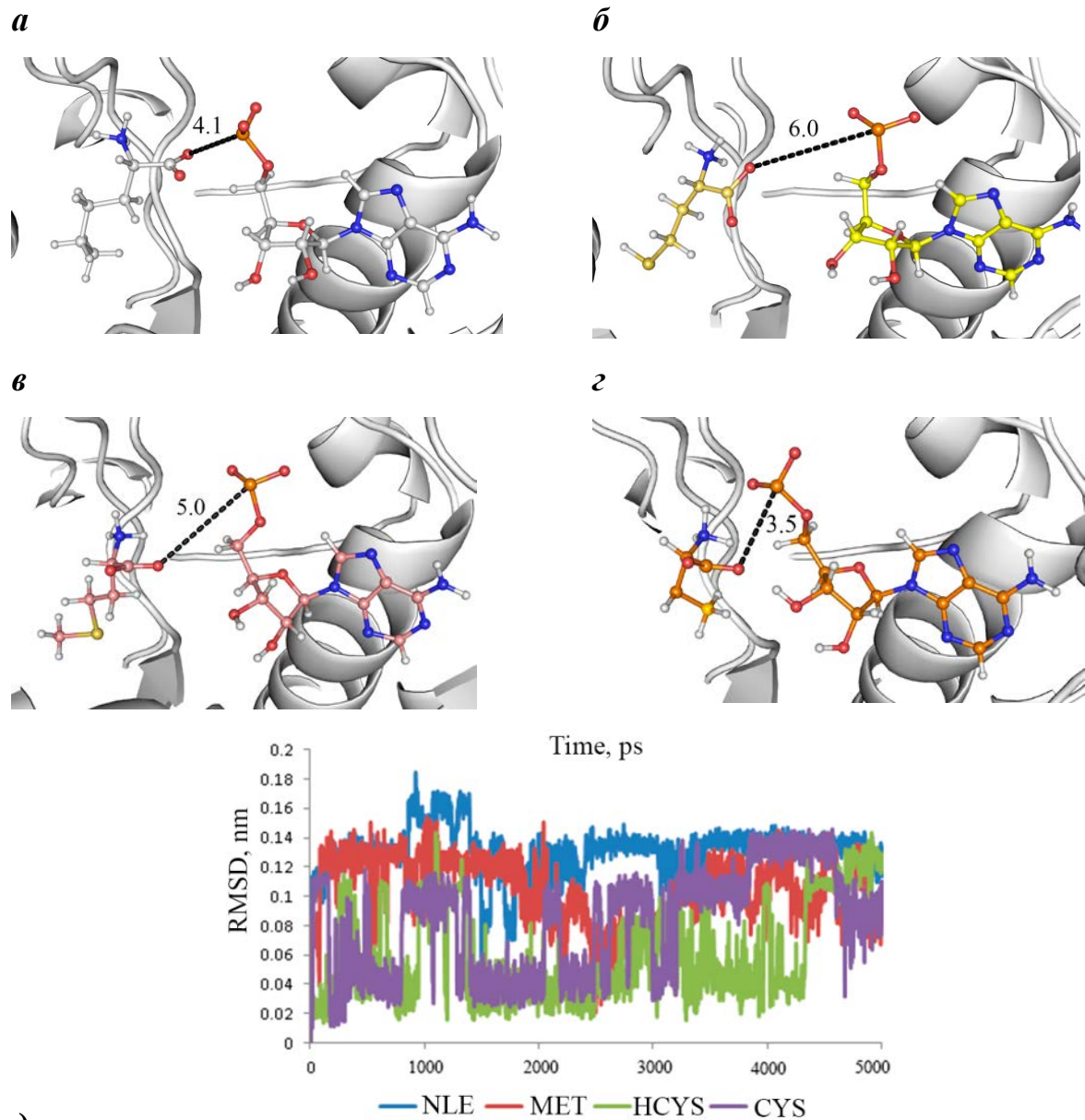


Рис.3.2. Результати докінгу для Nle (а), Hcys (б), Met (в), Cys (з) цвіттеріонів у активному сайті *LeuRSTt*. Молекула AMP займає однакове положення в усіх наведених прикладах. Порівняльне вирівнювання структур амінокислот та AMP (через велику рухливість всіх компонентів було створенно усереднені зображення протягом останніх 3нс динаміки). Графік RMSD (д) для ряду амінокислот приведено, щоб продемонструвати причини малої вірогідності утворення аденілатів цих залишків

Відображення електростатичних взаємодій (рис. 3.3) між лігандами та синтетазою, показує подібну тенденцію у зв'язуванні норваліну і лейцину із

амінокислотним оточенням синтетичного сайту. В той же час для молекули ізолейцину спостерігається зсув енергії зв'язування з  $-180$  kJ/mol до  $-110$  kJ/mol.

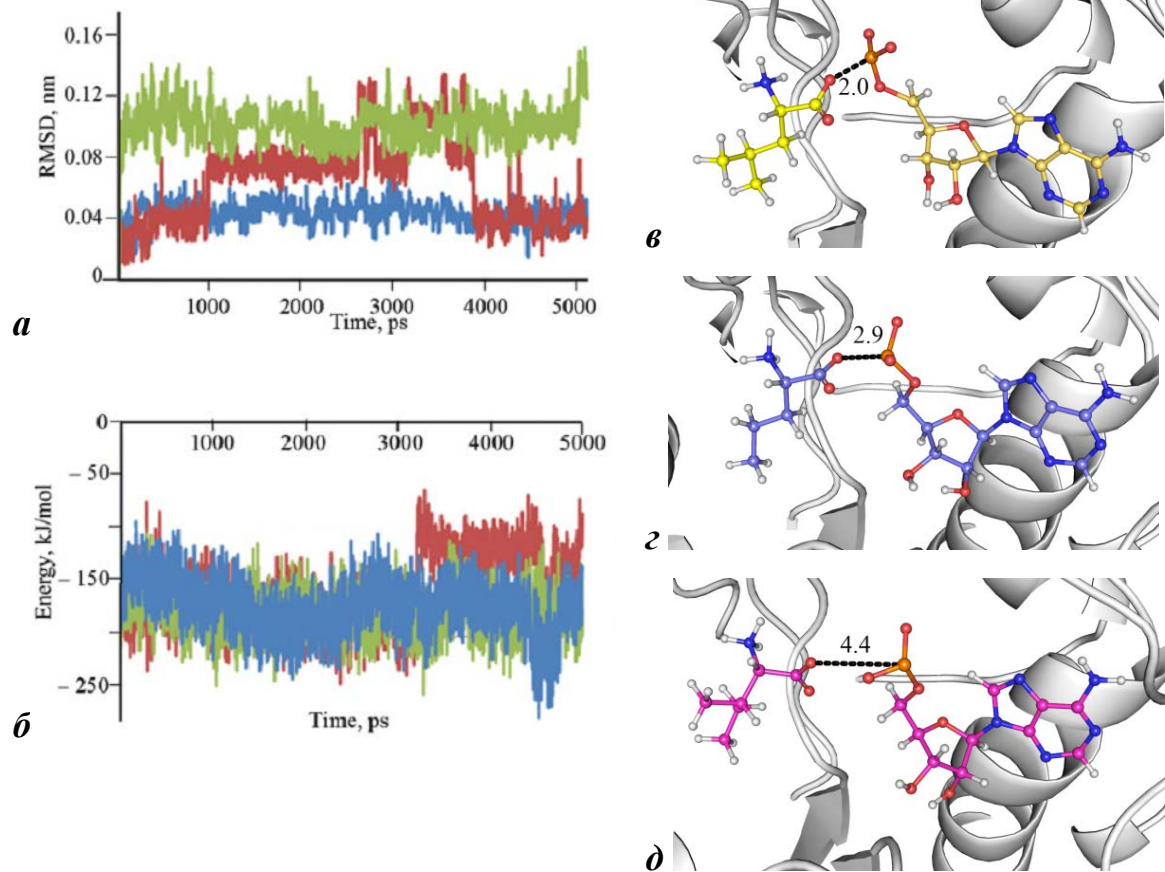


Рис. 3.3. Графіки RMSD (а) для амінокислотних субстратів та значення енергії електростатичної взаємодії (б) між субстратом та синтетазою (LeuRSt), розраховані протягом 5нс МД. Наочне зображення конформацій та взаємної геометрії AMP та лейцину (в), норваліну (г) та ізолейцину (д)

Така картина корелює із побічними даними щодо швидкості утворення ізолейцил-аденілату 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



унемоżliвлює швидкий перебіг реакції. Не дивлячись на те, що ізолейцин також зв'язується із Asp80, відстань до фосфатної групи AMP досить велика.

### **3.2. Вивчення аміноациладенілатів у активному сайті *LeuRSTt* та можливого механізму пре-трансферного редагування**

Щоб зрозуміти механізм зв'язування пре-трансферних субстратів у сайті аміноацилювання *LeuRSTt*, ми провели дослідження для кількох аміноациладенілатів шляхом використання молекулярного докінгу. Результати докінгу для 8 аміноациладенілатів, представлені в таблиці 3.2. Як можна побачити, аміноациладенілати демонструють абсолютно інші особливості зв'язування у порівнянні із амінокислотами.

Так у випадку аміноациладенілатів не виявлено значних відмінностей, виходячи із значень оціночних функцій GoldScore та ASP (табл. 3.2). Причиною є втрата певних ступенів свободи та наявність гідрофобного аденіну. Просторова орієнтація площини пуринового кільця відіграє значну роль при стабілізації будь-якого аміноациладенілату. Ймовірно, напруга, яка виникає при зближенні атомів фосфатної групи, впливає на конформацію рибози. Зазначимо, що група вирівняних сполук (*Leu-AD*, *Nva-AD*, *Нсус-AD*, *Пе-AD*) займає особливе місце, виходячи з конформацій фосфоестерного зв'язку.

На підставі цих результатів ми розпочали молекулярну динаміку для визначення змін внутрішньої енергії аміноациладенілату, яку можна оцінити, спостерігаючи за його конформаціями. Така симуляція повинна відобразити передумови перенесення амінокислот на тРНК. Молекулярна динаміка похідних лейцина, ізолейцину та норваліну показала, що найбільш стійким і конформаційно вигідним є лейцин, далі йдуть норвалін та ізолейцин (рис. 3.4). Цей порядок можна пояснити внутрішніми енергіями аміноациладенілатів, внутрішнім напруженням аміноациладенілатів під час знаходження в

аміноацилювальному сайті, які впливають на конформацію або форму амінокислоти. У випадку ізолейцину його жорстка структура унеможливорює фіксацію на місці для здійснення перенесення на ССА-кінець тРНК.

Таблиця 3.2

**Результат докінгу аміноациладенілатів (aa-AD) в аміноацилювальний сайт LeuRSTt**

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

Це добре узгоджується із експериментальними даними по ізотермічій титрувальній калориметрії, яка показала, що значення  $Kd$  для зв'язування Leu-AD у LeuRS із *E.coli* було більш ніж у 8000 разів нижче ніж для Ile-AD [46]. Цікаво, що після утворення аміноациладенілату такі амінокислоти, як цистеїн та валін, стали менш рухливими, через жорсткий ефірний зв'язок із фосфатною групою та водневі зв'язки, утворені між аміногрупами амінокислот та Asp80 в аміноацилювальному сайті ферменту.

Проте утворення цих інтермедіатів не відбувається через причини розглянуті у попередньому розділі. Tyr43 активного сайту екранує карбоксильну групу лейцину та норваліну, подібну до щита, і відхиляється у разі присутності ізолейцину.

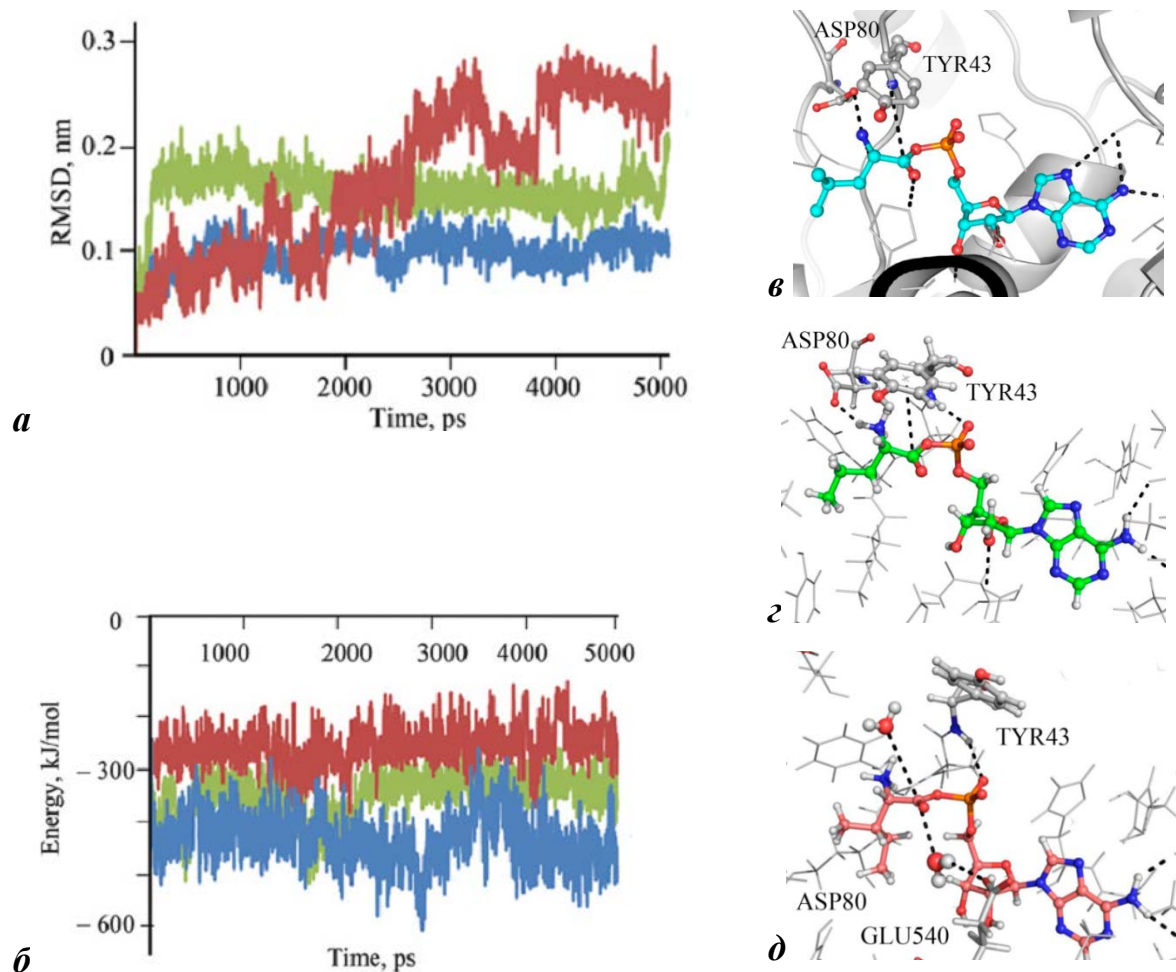


Рис. 3.4. На малюнку показані графіки RMSD (а), розраховані для аміноациладенілатів, та флуктуацій енергії електростатичних взаємодій (б) між лігандом (синій – Leu-AD, зелений – Nva-AD та червоний – Ile-AD) та синтетазою (LeuR*Stt*) протягом 5 нс МД і візуалізація результатів динаміки молекул Leu-AD (в), Nva-AD (г) та Ile-AD (д)

Це відхилення відбувається через вигин радикалу ізолейцину і дозволяє молекулам води проводити нуклеофільну атаку Ile-AD при асистуванні амідної частини Glu540 (рис. 3.4) і може бути одним із механізмів пре-трансферного редагування в аміноацилювальному сайті синтетаз [69].

Обидві молекули, Leu-AD та Nva-AD утворюють зв'язок із Asp80 та екрановані фенольним кільцем Tyr43, а орієнтація карбонільної групи є невигідною для атаки з іншого боку. Tyr43 разом із Pro42 утворює консервативний мотив PY, який зустрічається у групі LeuRS/IleRS/ValRS.

Наш підхід добре корелює із недавніми даними, які показують, що заміщення висококонсервативного тирозину (Tyr59) на треонін в синтетичному сайті *PeRSEc* впливає як на редагування, так і на аміноацилювання [70].

### **Підсумки:**

1. Створено моделі комплексів ряду амінокислот із АМР та пре-трансферних субстратів (аміноациладенілатів) в аміноацилювальному сайті *LeuRStt*.

2. Проведено аналіз передумов для утворення аміноациладенілатів в аміноацилюючому сайті. Визначено фізичні характеристики субстратів та продемонстровано їх поведінку за допомогою молекулярної динаміки, є причиною селективності при включенні в молекулу аміноациладенілату.

3. Представлено модель механізму захисту молекул *Leu-AD* та спорідненого до нього *Nva-AD* від гідролізу і причини гідролізу *Pe-AD*. Отримані результати корелюють із опублікованими експериментальними даними по мутаціях в аміноацилювальному сайті ферменту і відображують можливий механізм пре-трансферного редагування.

Матеріали досліджень даного розділу наведено у публікації:

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. doi:10.7124/bc.00090E.

## РОЗДІЛ 4

### ВИВЧЕННЯ МОЛЕКУЛИ АМІНОАЦИЛ-ТРНК ЯК ЕЛЕМЕНТУ СИЛОВОГО ПОЛЯ

Кристалічні структури LeuRS для *T. thermophilus*, *P. horikoshii* та ProRS із *E. faecalis* (PDB code: 1OVH, 1WKB, 2J3M) із незначними втручаннями для лейцинових систем та помітними для ProRS із *E. faecalis* були використані для вивчення механізмів редагування *in silico* [71, 72, 73].

Конформаційна рухливість остову нуклеїнових кислот зумовлена наявністю шести торсіонних кутів, саме тому молекулярна динаміка подібних надзвичайно гнучких систем значно складніша та, досить часто, значно триваліша ніж для молекул білків. До того ж нуклеїнові кислоти характеризуються наявністю заряджених фосфатних груп, що знов-таки вимагає досить точних розрахунків електростатичних взаємодій. Разом із вигинами остову ці характеристики вважаються вкрай важливими в процесі білок-нуклеїнового розпізнавання. Саме тому наші системи мають бути добре зрівноваженими, енергія внутрішнього напруження у контурі тРНК може порушити тісні взаємодії між тРНК та білком, особливо із рухливим CP1 доменом.

Незважаючи на те, що олігонуклеотиди із кінцевими 5 'фосфатами можуть бути симульовані у багатьох силових полях, однією із найбільш важливих особливостей поля Amber є чітке виділення кінцевих (кінцеві (перший та останій у ланцюзі) нуклеотидів у окремі елементи поля і поляризація атомів, що впливає на стабільність нуклеїнових кислот. Деякі дослідження показали, що найнижчі значення RMSD, як показника

стабільності, спостерігають під час моделювання нуклеїнових кислот із заміщенням 5'-кінцевих фосфатів атомами водню [74]. Відповідно до цих результатів, силове поле amber99 описує нуклеотиди в ланцюзі як від'ємно заряджені структури, тоді як нуклеотиди не мають цілого заряду - 3'-кінцевий нуклеотид має бути більш негативним ('-0,6919'), ніж 5'-кінцевий ('-0,3081'), а їх сума має дорівнювати '-1'. У разі моделювання фрагмента аміноацил-тРНК із оригінальними полями gmx основними складнощами було досягнення правильної параметризації ефірних зв'язків між нуклеотидними та амінокислотними фрагментами, що призвело до надмірної гнучкості фрагмента аміноацил-тРНК в ділянці зв'язування домену CP1 із каталітичною частиною ферменту.

На початку наших досліджень ми намагалися відтворити та застосувати метод, описаний в статті *Hagivara et al.* [75], для побудови та симуляції МД білково-нуклеїнового комплексу, де субстрат амінокислота-А76 (амінокислота ковалентно зв'язані із гідроксильним атомом рибози кінцевого нуклеотиду тРНК) знаходиться у CP1 домені. Проте спосіб простого об'єднання топологій виявився неприйнятним для вивчення механізму, що було особливо помітно при абсолютно схожій стабільності всіх трьох аміноацил-тРНК субстратів і неможливості інтерпретувати біохімічні дані (Розділ 5).

Електростатичний потенціал (ESP) молекули є усталеним інструментом у медичинській хімії, моделюванні та обчислювальній хімії [76]. Найкращим способом вирішення деяких обмежень при розрахунках є застосування RESP (обмеженого електростатичного потенціалу) для визначення парціальних зарядів, виходячи із квантово-механічно розрахованого MEP (Molecular electrostatic potential) із використанням атомно-центрованої моделі точкових зарядів, що складає основу силового поля Amber.

MEP було отримано із електронних розрахунків структури із базисом HF/6-31G\*\* в пакеті Gamess [77]. Проте раніше було продемонстровано, що

цей метод створює фізично нереально високі заряди на атомах, віддалених від молекулярної поверхні, переносячи заряди всередину об'єму молекули [55]. Тоді, щоб уникнути цієї проблеми, було запропоновано здійснити функцію гіперболічного обмеження для зарядів важких атомів, щоб зменшити їх величину під час процедури розрахунку заряду. Щоб продемонструвати важливість правильних зарядів, ми вирішили перевірити протокол моделювання таких нестандартних залишків, використовуючи AnteRed з сервера R.E.D.III [78]. Жодна з програм GAMESS чи Gaussian не здатна створити єдину орієнтацію та конформацію молекули у просторі для конфігурації енергетичного мінімуму. Внаслідок цього різні набори RESP/ESP розраховуються для однієї і тієї ж енергетичної точки з урахуванням різних конформацій. Щоб вирішити проблему уніфікації структури алгоритм Rigid Body Re-orientation Algorithm (RBRA), який реалізується R.E.D.III сервером, був застосований для кожної мінімізованої структури безпосередньо перед розрахунком MEP, щоб отримати однакові відтворювані заряди RESP. У кількох наших публікаціях цей етап опущений, однак це не менш важливо, ніж пошук лігандів, конфігурація зв'язків, або оптимізація та рівновага системи.

Намагаючись сформувати набір задовільних моделей, обчислення зарядів для кожного фрагмента аміноацил-тРНК було виконано методом RESP [79] на основі єдиної конформації та після впровадження RBRP (рис. 4.1).

Якість прогнозованої топології оцінювалася за відносною середньою квадратичною помилкою (RRMS), способом зіставлення ESP, одержаного із молекул при використанні обмежень заряду та без нього, та за результатами молекулярної динаміки. Нарешті, R.E.D. інтегрував заряди в окрему бібліотеку силового поля, для використання в моделюванні молекулярної динаміки [54].

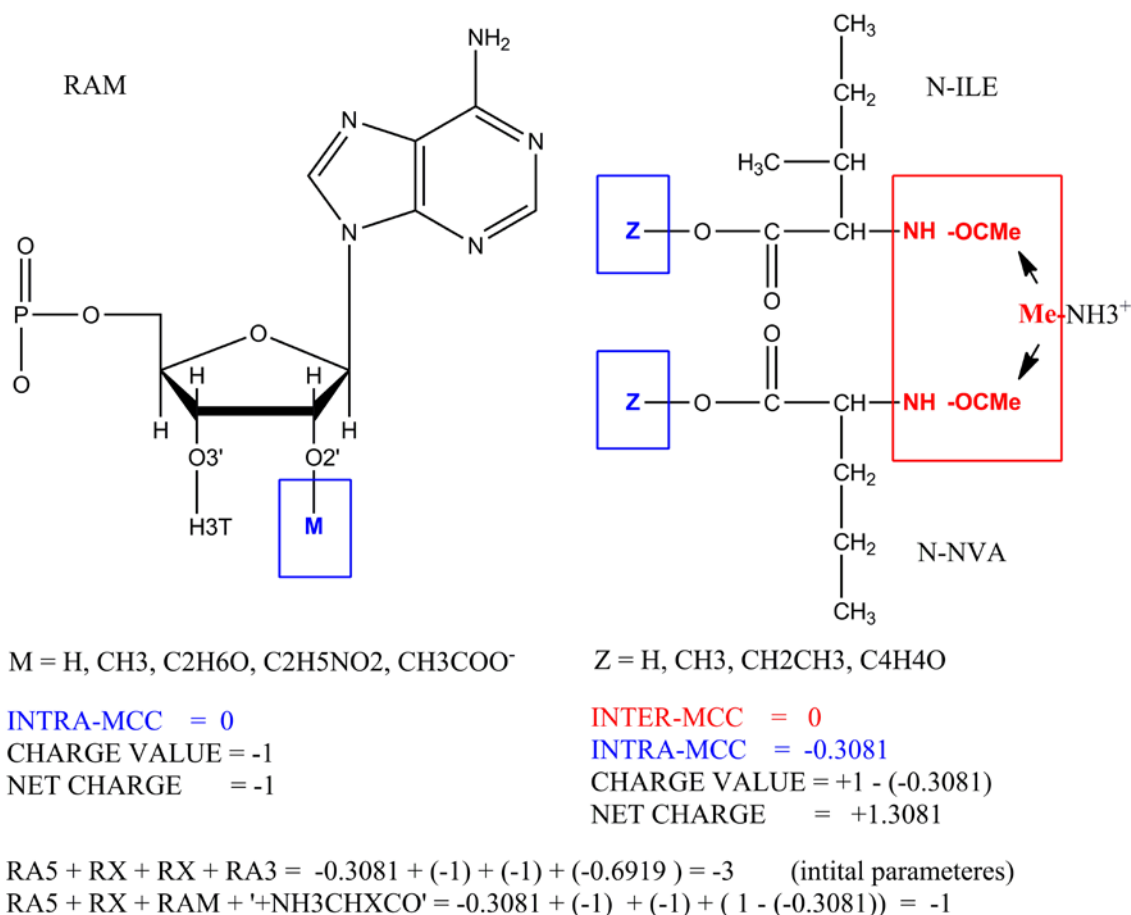


Рис. 4.1. Механізм отримання заряду за допомогою алгоритмів R.E.D.III. Розрахунок розподілу заряду для молекул із цілим зарядом (аденозин та амінокислоти із зарядами, що закладені в силовому полі) із штучно побудованою групою атомів у вхідній структурі (M, Z). Подальше усунення цих груп із розрахованими для атомів зарядами із вихідної структури впливає на перерозподіл заряду у кінцевих вихідних молекулах. Так, кінцевий аденозин отримує сумарний заряд '-1', при цьому розподіл точкових зарядів на атомах відрізняється від того, що запропонований в силовому полі для звичайного аденозину у ланцюзі. А амінокислотний залишок отримує сумарний заряд '1.3081', завдяки відщепленню атомів груп M та Z разом із їх точковими (парціальними) зарядами

Для того, щоб відповідати силовому полю amber, загальний заряд структури субстрату "RA3 + NH<sub>3</sub>CHRCO-Z" повинен відповідати загальному



заряду 3'-кінцевого нуклеотиду (RA3) '-0,6919', тоді як значення заряду 5'-кінцевого нуклеотиду (або RA5) залишається незмінним і дорівнює "-0.3081". Молекула, яка представляє інтерес, повинна формуватися шляхом розрахунку двох частин (нуклеотида та амінокислоти), дотримуючись документації R.E.D.III [будівництво N-кінцевого фрагмента амінокислоти], щоб відповідати вихідному заряду "-0.6919", притаманному 3'-кінцевий залишку tРНК. Таким чином, ми виявили найкращу модель розподілу заряду, коли кінцевий RA3 замінюється на RAM. RAM - це M-заміщений RA3, де M - це метил, диметил, гліцин або ацетатна групи, зв'язані із O2 «рибози» (рис. 4.1).

Результатом такої процедури стало одержання майже універсальної моделі заряду для 3'-кінцевого нуклеотиду із суттєвими змінами, що стосуються лише атомів, що беруть участь у формуванні аміноацильного ефіру, а саме C2'-O2' (або C3'-O3' у випадку ProRS). Загальна модель розподілу заряду та загальний заряд молекули аденозину залишились майже незмінними, що дозволяє використовувати таку модель при включенні інших амінокислот у розрахунки. Що стосується параметризації '+ NH<sub>3</sub>CHXCO', яке стає термінальним залишком, значення INTRA-MCC, застосоване до групи Z, стало "-0.3081" замість "-0.4376", а вихідний загальний заряд молекули становив +1.3081.

Представлені найбільш коректні заряди RESP, розраховані для досліджуваних нуклеїнових модифікацій і вибрані за найнижчими значеннями RRMS. Так було отримано набір відносно невеликих значень RRMS в діапазоні 0,076-0,095 для етапу приладки зарядів між MEP, розрахованим квантовою хімією та зарядів, сформованих із RRBA. Значення RRMS 0,85-0,13 було розраховано за відсутності обмежень заряду. Цей протокол був перевірений на субстратах Nva-tRNA<sup>Leu</sup> та Ile-tRNA<sup>Leu</sup> для LeuRS із *T.thermophilus*, а потім застосований для субстрату Ala-tRNA<sup>Pro</sup> із системи ProRSEf [80]. Процедури оцінки помилок (RRMS) дали допустимі значення

0.046-0.068, тоді як заряди із QM розрахунку та RESP порівнювалися і мали трохи вищі значення 0.08-0.95, із розрахунком RESP без обмежень (MCC).

Не було суттєвої різниці між ‘single-point’ розрахунками для мультikonформаційного простору (або орієнтацій, запропонованих RRBA) для амінокислотної частини аміноацилу. Компактні та неполярні замісники, такі як 1-метилетиловий ефір та OMe, дали найменшу похибку для приладки зарядів амінокислот. У свою чергу, нуклеотиди із заміщеннями на ацетат та гліцин показали найнижчі значення RRMS і найкращі результати в МД.

Таким чином, наші моделі зарядів впливають не тільки на групу атомів ефірного зв'язку, оскільки заряд атома O2 був різним для цих двох залишків. Щоб генерувати універсальні параметри RESP, необхідне деяке усереднення моделі, оскільки це наближення сильно впливає на конформаційну варіацію вивчених амінокислотних фрагментів. В результаті були отримані дані, що добре корелювали із біохімічними показниками.

### **Підсумки:**

1. Розроблено усереднену модель розподілення зарядів для різних аміноацилів із кінцевим аденозином tРНК.
2. Створено бібліотеку досліджуваних структур аміноацил-tРНК із підготовленими топологіями для запуску молекулярної динаміки.

Матеріали досліджень даного розділу наведено у публікації:

Rayevsky AV, Tukalo MA. Computational approaches for parameterization of aminoacyl-tRNA synthetase substrates. *Biopolymers and Cell*. 2018;34(3):239–247. doi:10.7124/bc.00097E.

## РОЗДІЛ 5

### ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДІВ ВИВЧЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ПОСТ- ТРАНСФЕРНОГО РЕДАГУВАННЯ

#### 5.1. Валідація методу параметризації на прикладі LeuRS із *T.thermophilus* із спорідненим субстратом Leu-tRNA<sup>Leu</sup>

Перед проведенням основних досліджень, запропонована методика була перевірена на двох системах лейциновій і проліновій з різних організмів, спираючись на експериментальні дані. На даному етапі проводилась молекулярна динаміка з використанням двох відомих методів параметризації аміноацил-тРНК, проста комбінація топологій амінокислоти та нуклеотидного залишку та R.E.D.III метод визначення розподілу зарядів.

LeuRS є характерним представником APCаз I класу, який аміноацилює 2'ОН атом рибози та має функцію пост-трансферного редагування. Зазвичай лейцил-тРНК не має гідролізуватись у редагувальному домені CP1 дикого типу (WT). Але мутація T252A в цьому домені збільшує ймовірність такої події, дозволяючи зв'язувати лейцил- та ізолейкецил-тРНК з її подальшою дисоціацією на вихідні компоненти реакції аміноацилювання [81, 82]. На сьогодні механізм гідролізу аміноацил-тРНК позиціонується як двоступенева реакція. На першому етапі гідролізована молекула повинна приймати правильну геометрію - дві пари водневих зв'язків (Thr247 з карбонільним киснем / Asp347 з аміногрупою амінокислоти) стабілізуються і активують карбонільну групу. Після цього молекула води (W1) повинна атакувати активований карбонільний вуглець, одночасно активуючись іншою молекулою води (W2). При цьому утворюються водневі зв'язки з оточуючими

амінокислотами сайту зв'язування. Для симуляції лейцил-тРНК у стані пост-трансферного редагування ми використовували білок дикого типу та мутант T252A і R.E.D.III процедуру визначення зарядів та альтернативний метод простого поєднання топології, описаний у статті Nagivara et al. [75]. Результати представлені на рис. 5.1.

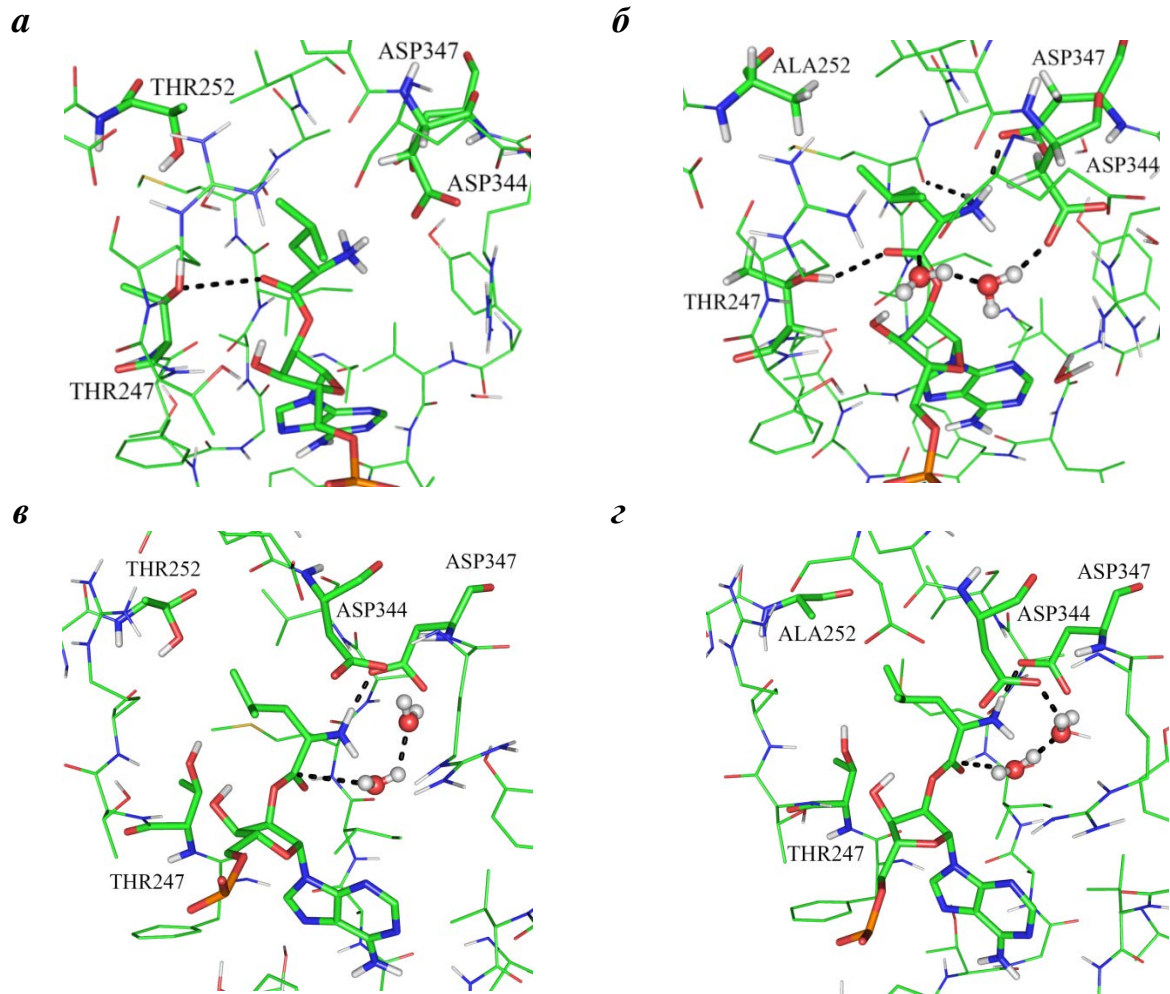


Рис. 5.1. Найбільш стабільні та наочні приклади структур з МД, підготовлених з використанням R.E.D.III (*а, б*) або комбінації топологій (*в, г*), відповідно для дикого типу (*а, в*) та мутантного білка (*б, г*) з Leu-tRNA<sup>Leu</sup>. У випадку використання R.E.D.III модель Leu-tRNA<sup>Leu</sup> зберігала кут повороту лейцину в бік групи рибози, утворюючи водневі зв'язки з Thr247 і Asp347

У випадку використання R.E.D.III алгоритму конформація та наближення молекул води до складного естеру фрагмента лейцил-тРНК значно залежить від залишку в положенні 252 домену CP1. У WT молекула лейцил-тРНК слабо взаємодіє із Asp347 і Thr247 (рис. 5.1, а та 5.1, б), 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.5.1, б).

Однак метод простої комбінації топологій виявився невідповідаючим потребам дослідження механізму, особливо через абсолютну подібність поведінки субстратів та неможливості інтерпретувати опубліковані біохімічні дані [46, 68]. Неправильний розподіл заряду у моделі, що була підготовлена за допомогою комбінації топологій, викликає підвищене обертання амінокислотного радикала незалежно від залишку в положенні 252 та втрату взаємодії із Thr247 (рис. 5.1, в та рис. 5.1, г). Застосування комбінованої топології N-лейцину з не кінцевим аденозином не виявило жодних суттєвих відмінностей у зв'язуванні Leu-tRNA<sup>Leu</sup> ані в білку дикого, ані мутантного білків. Конформація Leu-tRNA<sup>Leu</sup> залишалася майже незмінною протягом МД незалежно від наявності мутації, але кількість молекул води біля карбонільного вуглецю лейцину зросла у випадку мутантного домену.

Для моделі Leu-tRNA<sup>Leu</sup>, 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. У той же час Asp347 взаємодіє з аміногрупою лейцил-тРНК, зменшуючи кількість можливих ступенів свободи (рис. 5.1, а).

Взаємодія Leu-tRNA<sup>Leu</sup>, створеної за допомогою комбінації топологій, з амінокислотами сайту зв'язування також не залежала від наявності мутації, в обох випадках Thr248 і Asp347 утворювали міцні водневі зв'язки з 3'ОН групою рибози та аміногрупою лейцину відповідно. У той же час, залишок

Thr247, який, як було доведено, є критичним для процесу гідролізу, не утворював контактів з карбонільним киснем лейцину (рис. 5.2).

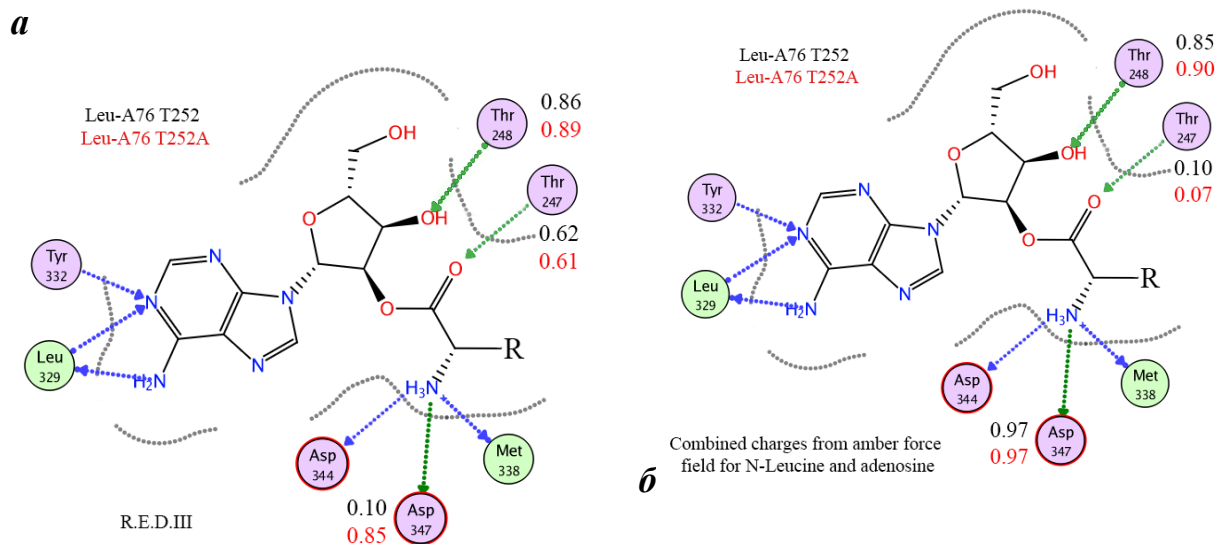


Рис. 5.2. Аналіз МД представлено у вигляді мап, що відображають фармакофорні групи та час існування взаємодій із амінокислотним оточенням. Так фармакофорні мапи продемонстрували залежність між мутацією в положенні 252 лише для моделі, параметризованої за допомогою R.E.D.III (а), на відміну від другого методу параметризації (б)

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.

## 5.2. Приклад проведення дослідження механізму гідролізу в INS домені ProRS із *E.faecalis*

Спираючись на отримані дані щодо активності ферменту було проведено параметризацію субстрату та ряд молекулярних динамік комплексу ProRSEf. Модель пролінової аміноацил-тРНК синтетази була

розроблена на основі повнорозмірної кристалічної структури ProRSEf [50] і відрізняється від представленої в літературі моделі Кумара і співавторів, що представляє лише частину субстрату, 5'-CCA-Ala, пов'язану із вільним доменом INS (редагувальним доменом) [83, 84]. Для моделювання механізму реакції деацилювання Ala-tRNA<sup>Pro</sup> ензимом ProRSEf були використані квантово-хімічні методи в поєднанні з молекулярною динамікою.

Молекула фрагменту тРНК була побудована за допомогою програмного забезпечення Marvin Sketch. Робоча модель ProRS із CCA'-кінцем, напрямленим у INS домен була отримана за допомогою сервера HADDOCK. Структура комплексу ProRS у комплексі із тРНК в аміноацилувавальному сайті була люб'язно представлена др. S. Cusack (EMBL Grenoble Outstation, France).

З метою створення повноцінної структури, що відповідала б усім вимогам експерименту по пост-трансферному редагуванню було вирішено провести білок-нуклеїновий (для розвороту стебла тРНК) та ліганд-білковий докінги. На рис. 5.3 показано конформацію ланцюга тРНК (знизу догори) та контакти цього ланцюга із рядом амінокислот, які на основі експериментальних даних можуть бути залучені у процесі фіксації стебла. Також було проаналізовано енергію амінокислот у ланцюзі INS домену кожної із можливих конформацій за допомогою серверу Swiss-model (графік Atomic Non-Local Environment Assessment). Під час запуску гнучкого докінгу було визначено два напівгнучких сегмента: останні 5 основ 3'-кінця тРНК та 5 залишків кожного із ланцюгів лінкерної ділянки, що зв'язує INS домен із каталітичною частиною. Окрему увагу було відведено амінокислотним залишкам, які мали вплив на зв'язування 3'-кінця тРНК в процесі експерименту *in vitro*. Для звуження діапазону пошуку були визначені "консервативні" залишки білка в областях взаємодії білок-РНК у кристалічній структурі.

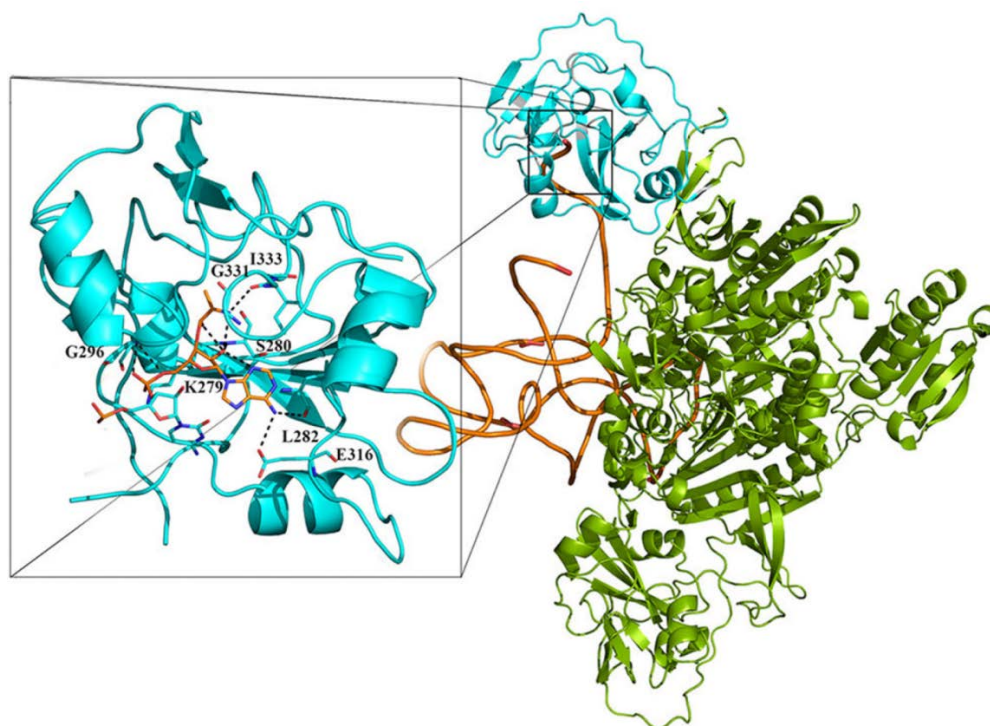


Рис. 5.3. Стабільна структура комплексу аланіл-tRNA<sup>Pro</sup> та ProRSEf у редагувальній конформації

Аналіз та оцінка результатів РНК-білкового докінгу проводилась у програмі VMD, базуючись на орієнтації основ та кількості водневих зв'язків, що сформувалися між тРНК та амінокислотними залишками фермента. Докінг фрагменту Ala-tRNA<sup>Pro</sup> у INS домен синтетази проводився за допомогою програми Gold. Всього було проведено 20 запусків докінгу. Кожні 400 пс продовж всієї вільної 20 нс динаміки ми екстрагували структуру INS домена.

Усі можливі конформації ліганду були кластеризовані за RMSD та локальним мінімум енергії зв'язування ліганда та білка. Відібрані результати були проаналізовані за допомогою програми Chimera. Для подальшої молекулярної динаміки був використаний комплекс із правильно орієнтованим лігандом, що мав достатню кількість водневих зв'язків, утворених пуриноювою частиною та аміногрупою ліганда.

У представленій моделі [73] (рис. 5.3) кишеня, в якій розташований активний центр, в значній мірі перекривається із передбачуваним активним центром, описаним раніше у Крепіна і співавторів [50], включаючи такі



функціонально важливі елементи, як мотив 331-GlyXXXPhe-335 і Lys279. Для візуалізації поведінки комплексу у часі була запущена молекулярна динаміка (МД).

При цьому Lys279 зв'язується із фосфатною групою A76 аланіл-tRNA<sup>Pro</sup>. Ця взаємодія відповідає результатам рентгеноструктурного аналізу апофермента, де залишок лізину координує сульфат-іон, і, безумовно, є критичною для розташування 3'-кінця тРНК в активному сайті редагувального домену ProRSEf. Але безпосередньої участі в реакції гідролізу помилкового аміноацилу Lys279 не приймає, так як знаходиться на значній відстані від зв'язку який гідролізується [50]. Як видно із малюнка, що відповідає середині молекулярної динаміки, аміногрупа аланіну формує водневі зв'язки із амінокислотами Gly331, Ile333, а нуклеїнова частина аміноацилу утворює зв'язки із Lys279, Ser280, Leu282 (рис. 5.4). Lys279 взаємодіє із залишком фосфорної кислоти A76 tRNA<sup>Pro</sup>.

Lys279 взаємодіє також з O2' C75 і 2'-ОН групою C74, сприяючи вигину ССА-кінця тРНК. Аденін A76 залучений у іншу стабільну взаємодію між редагувальним доменом ProRSEf і субстратом. Ця азотиста основа також вступає у стекінг із Phe330. Залишок аланіна із Ala-tRNA<sup>Pro</sup> зв'язується із гідروفобним карманом редагувального домену. Його фіксують аміногрупи основного ланцюга Gly331 і Ile333 (залишки мотиву Gly331-XXX-Phe335). Бічна метильна група залишку аланіну знаходиться в гідروفобній кишені, раніше показаній Кумаром і співавторами [84], яка включає Ile263, Ile277, His366 і Val266 [73].

Детальний аналіз траекторій молекулярної динаміки у програмі VMD показав, що водневі зв'язки між вищезазначеними амінокислотами INS домена ProRSEf та атомами ліганду є досить стабільними. Після цього були визначені усі можливі молекули води, що підходили до атомів карбоксильного вуглецю та аміногрупи впродовж динаміки. Це давало інформацію як щодо номеру молекули в системі, так і відносно приблизного часу контактного положення.

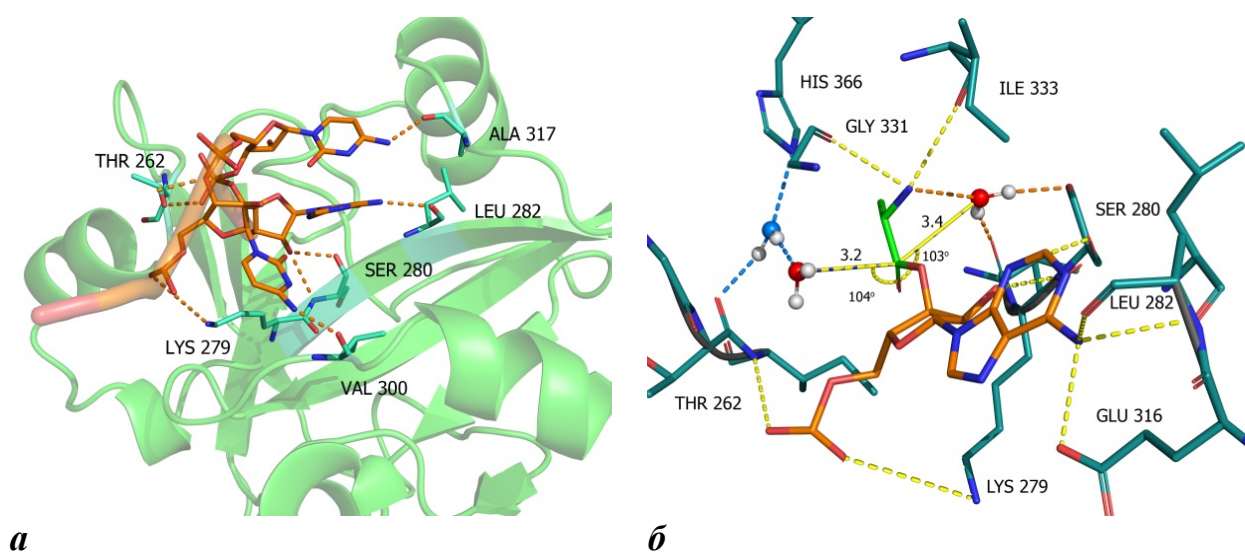


Рис. 5.4. На малюнку зображено: стабільну структуру тРНК та INS домену із позначеними водневими зв'язками та залишками, що їх формують (а); модель розташування аміноацилу в середині сайту та геометрію молекул води та їх зв'язків із аміноацилом та певними амінокислотами (б).

За цим даними було відсіяно ті молекули, час знаходження яких біля зазначених атомів був мізерно малим для процесу реакції. Ті молекули, що залишились, були досліджені на предмет позиції воднів, кута наближення до атомів за допомогою інструмента Measurement пакета PyMol. Таким чином було вибрано фрейм динаміки, на якому дві молекули води утворювали необхідний кут  $104\text{-}105^\circ$  на відстані до  $3.5\text{Å}$  від атома вуглецю та водневі зв'язки із білковим оточенням (рис. 5.5). Така конфігурація зберігалась на протязі 50 пікосекунд, при цьому аланіламіноацил також знаходився у вигідному положенні для атаки [73]. Ключова роль 2'-ОН групи А76 в гідроліз підтверджується розрахунками DFT [73]. При цьому, 2'ОН групу і амінокислотний залишок обертаються, щоб знайти конформацію, яка може координувати карбонільну групу, що утворює стійку семичленну циклічну структуру. Це збільшує електрофільність вуглецю  $\text{C}=\text{O}$  групи і тим самим сильно полегшує нуклеофільну атаку молекули води. Потім дві молекули води

наближуються до карбонільного атома амінокислоти, яку слід відщеплювати. Одна з них (W1) нагадує координовану молекулу із закристилізованого апофермента та докінгову модель. Молекула води є стабільною і атакує електрофільну групу карбону та гідролізувати ефірний зв'язок (рис. 5.5).

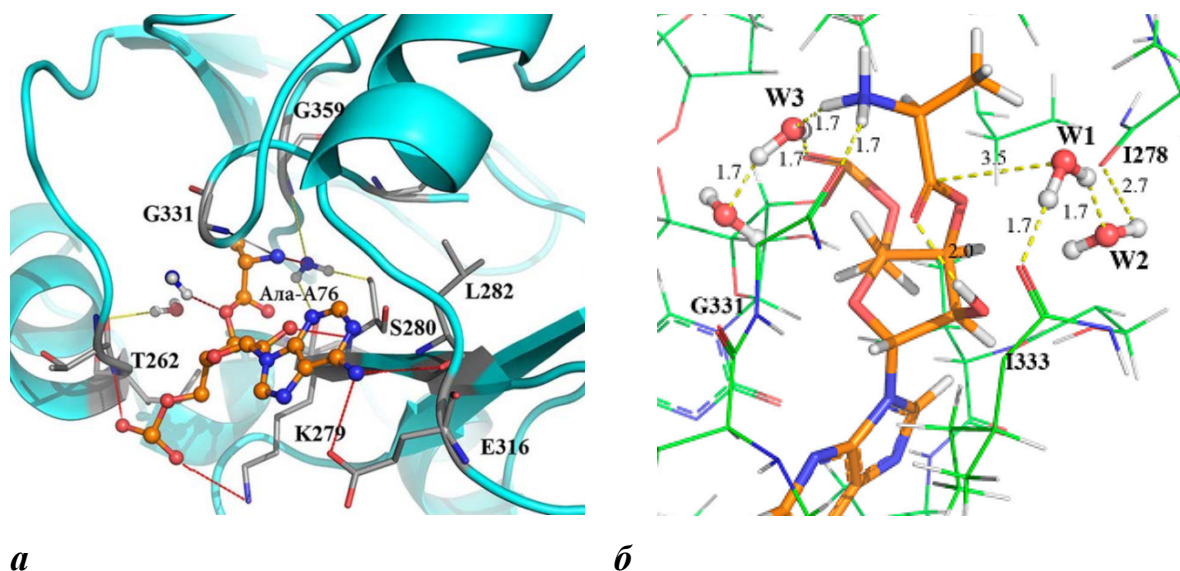


Рис. 5.5. Один із стабільних конформаційних станів молекулярної динаміки (а) та оптимізована геометрія редагувального сайту (б), що відповідає предреакційному стану, і молекули води (W1 і W2), залучені в гідролізі

У той же час, ця молекула води утворює водневі зв'язки із Пе333 та другою молекулою води (W2), яка, у свою чергу, утворює водневий зв'язок із карбонільним атомом кисню залишку Пе278. Координація протона, що походить з молекули W1, залишком Пе333 спостерігається протягом всього процесу. У цій точці протонувана аміногрупа аланіну утворює два водневі зв'язки. Перший зв'язок із карбонілом Gly331, другий - із фосфатним аніоном через третю молекулу води W3. Молекула W3 не бере безпосередньої участі в хімічній реакції, але її координуюча роль залишається незмінною під час гідролізу.

Важливо, що залишок Ala конформаційно фіксується водневими зв'язками, що обмежують її ступені свободи і полегшує гідроліз. Тоді W1 атакує карбонільну групу аланіну, а у перехідному стані починає формуватися новий зв'язок C–OH. У той же час другий протон цієї молекули води переноситься на 3'-О рибози.

### **Підсумки:**

1. Змодельовано структури LeuRS та ProRS у комплексі із аміноацильованими тРНК в редагувальному положенні.
2. Відпрацьовано та перевірено протокол створення коректної топології та запуску молекулярної динаміки і аналізу результатів на прикладі APCаз різних класів.
3. Представлено механізм редагування, в якому утворюється внутрішньомолекулярний водневий зв'язок між 2'-ОН-групою рибози та карбонільним киснем аланіну аланіламіноацилу, що полегшує реакцію гідролізу при наявності двох молекул води і міцної водневої сітки між всіма учасниками реакції
4. Показано спільні риси процесу пост-трансферного в аміноацил-тРНК синтетаз I та II класу, а саме, участь одночасно двох молекул води під час гідролізу та функції OH-груп кінцевого аденозину молекули тРНК.

Матеріали досліджень даного розділу наведено у публікації:

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.

## РОЗДІЛ 6

### ВИВЧЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ПОСТ-ТРАНСФЕРНОГО РЕДАГУВАННЯ В СПЕЦІАЛІЗОВАНИХ ДОМЕНАХ АРСАЗ РІЗНИХ ОРГАНІЗМІВ

#### 6.1. Підготовка структур комплексів LeuRS

На сьогодні більшість знань про редагування LeuRS отримано для прокариотичних ферментів [23, 25, 27, 45, 46, 67, 85, 86, 87]. Кристалічна структура *Thermus thermophilus* LeuRS в комплексі із аналогом субстрату пост-трансферного редагування Nva2AA (норваліл-тРНК з амідним зв'язком), вперше показала особливості зв'язування субстрату в CP1 домені лейцинової системи [86]. Щоб уникнути помилок, LeuRS проводить редагування амінокислот і до і після зв'язування із тРНК [23, 25, 45, 46, 75, 86, 87, 89].

Щодо LeuRS із еукаріотів та архей, зараз немає структурної інформації про комплекс природніх амінокислот у складі аміноацил-тРНК у редагувальному сайті ферменту. У той же час еукаріотичні / археальні підтипи LeuRS архітектурно відрізняються від бактеріальних LeuRS [24]. Тому структурні дані та запропоновані механізми редагування, досліджені на бактеріальних системах, не можуть бути безпосередньо застосованими для еукаріотичних та архейних LeuRS.

Структури еубактеріальної та археальної LeuRS без субстрату, проте із повноцінною тРНК, пройшла 100 нс молекулярної динаміки для релаксації ССА'-кінця тРНК в редагувальному сайті (рис. 6.1).

Щоб дослідити природу селективності амінокислот у сайті редагування, ми провели дослідження молекулярного моделювання на LeuRS із *T. thermophilus* та *P. horikoshii* із двома пост-трансферними субстратами

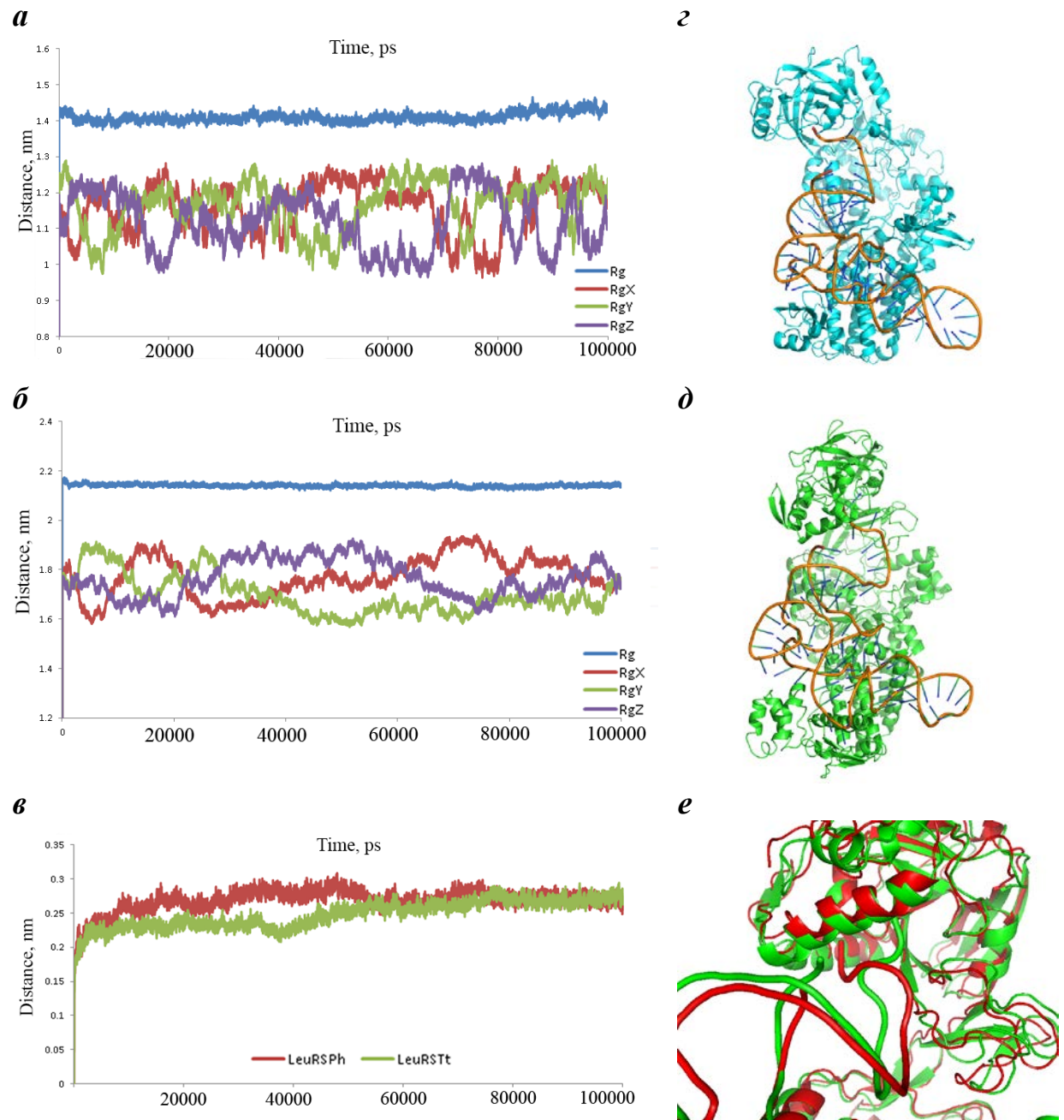


Рис 6.1. Аналіз траєкторій МД комплексів аміноацил-тРНК синтетаз із *T.thermophilus* (а, с) та *P.horikoshii* (б, д). Графіки радіусів гірації (а, б) демонструють стабільність доменної архітектури та комплексу білка з тРНК. Графік RMSD (е) свідчить про зниження рухливості амінокислотних залишків після 60 нс МД. Структур аміноацил-тРНК синтетаз *T.thermophilus* (с) та *P.horikoshii* (д) після релаксації. В результаті молекулярної динаміки частина тРНК змодельована в пост-трансферній конформації змінює кут взаємодії із CP1 доменом (е)

У кожному з цих досліджень ми вивчали два повнорозмірні комплекси: Nva-tRNA<sup>Leu</sup>-LeuRS та Ile-tRNA<sup>Leu</sup>-LeuRS. Кристалічні структури LeuRS<sup>*Tt*</sup> (PDB code: 1OBH) і LeuRS<sup>*Ph*</sup> (PDB code: 1WKB) ми взяли з бази RCSB. Щоб мати змогу пояснити специфічність редагування пост-трансферних субстратів було створено модель механізму редагування в CP1 домені, а доковані конформації були взяті як початкові структури для досліджень моделювання МД.

Знання механізмів редагування та структурних передумов вибору субстрату є важливими як для розуміння основних аспектів перекладу генетичної інформації, так і для деяких прикладних аспектів. Так LeuRS є цікавими мішенями для розробки антиінфекційних препаратів [90, 91, 92]. Процедура розробки препарату має базуватися на повному та чіткому розумінні механізму, який забезпечує правильне функціонування цільового ферменту. Ще однією перспективою є введення в природу неканонічних амінокислот як елегантного способу для хімічної диверсифікації антимікробних пептидів [93].

## 6.2. Вивчення редагувального домену LeuRS із *T.thermophilus*

Редагувальний сайт LeuRS має специфічність щодо амінокислот. Були виявлені два ключових консервативних залишки редагувального домену, які продемонстрували важливий вплив на активність редагування LeuRS, при заміні на аланін. Перший – Asp347 в редагувальному домені *T.thermophilus* LeuRS, що є консервованим як для всіх відомих LeuRS, так і для гомологічних доменів CP1 у ValRS та IleRS [88]. Заміна цієї аспартинової кислоти на аланін призвела до значної втрати активності пост-трансферного редагування для всіх цих ферментів. Другий - Thr252, який несе відповідальність за відрізнення подібних до лейцину амінокислот [47, 94].

Останнім часом було показано, що CP1 домен не тільки розрізняє споріднену амінокислоту від неспорідненої, але також демонструє певні переваги серед неспоріднених амінокислот. Наприклад, для *E.coli* було показано, що гідроліз  $\text{Pe-tRNA}^{\text{Leu}}$  протікає на порядок повільніше, ніж  $\text{Nva-tRNA}^{\text{Leu}}$  [87]. Крім того, недавні експерименти *in vivo* показали, що редагувальна активність LeuRS із *E.coli* спрямована на запобігання включення саме небілкової амінокислоти норваліну [46]. Структурна основа такої селективності ще не зрозуміла.

**6.2.1. Молекулярна динаміка комплексів  $\text{Nva-tRNA}^{\text{Leu}}$ -LeuRS та  $\text{Pe-tRNA}^{\text{Leu}}$ -LeuRS.** Для вивчення структурних основ селективності редагувального домену LeuRS з різними аміноацил-тРНК було проведено ряд молекулярних динамік повнорозмірних LeuRS із аміноацильованою тРНК ( $\text{Nva-tRNA}^{\text{Leu}}$  або  $\text{Pe-tRNA}^{\text{Leu}}$ ). Для одержання повнорозмірної структури тРНК без розривів, як у кристалі, було використано внутрішню бібліотеку структур нуклеїнових кислот серверу 3DNA. П'ять нуклеотидів, яких бракує в антикодоновій петлі закристилізованих структур [2BTE, 2V0G], реконструювали в автоматичному режимі.

Під час моделювання МД енергія кулонівських взаємодій між пост-трансферним субстратом  $\text{Nva-tRNA}^{\text{Leu}}$  (Nva-A76) та доменом CP1 поступово збільшувалася приблизно з 350 пс, а потім стабілізувалася протягом 5 нс, і в середньому становила - 355,3 кДж/моль. У випадку  $\text{Pe-tRNA}^{\text{Leu}}$  (Pe-A76) спостерігалася значно нижчі значення енергії кулонівських взаємодій із середнім значенням -210,1 кДж/моль протягом МД (рис. 6.2). Середня кількість міжмолекулярних водневих зв'язків для Nva-A76 та Pe-A76 становила 9,1 та 7,3 відповідно (рис. 6.2 та табл. 6.1). Ці показники вказують на те, що Nva-A76 краще зв'язується із редагувальним сайтом.

RMSD аміноацил-тРНК фрагментів демонструють тенденцію до стабілізації саме Nva-A76 в редагувальному домені, що може свідчити про те,



що саме норвалін має проходити відсів на цьому етапі забезпечення точності аміноацилюванн тРНК.

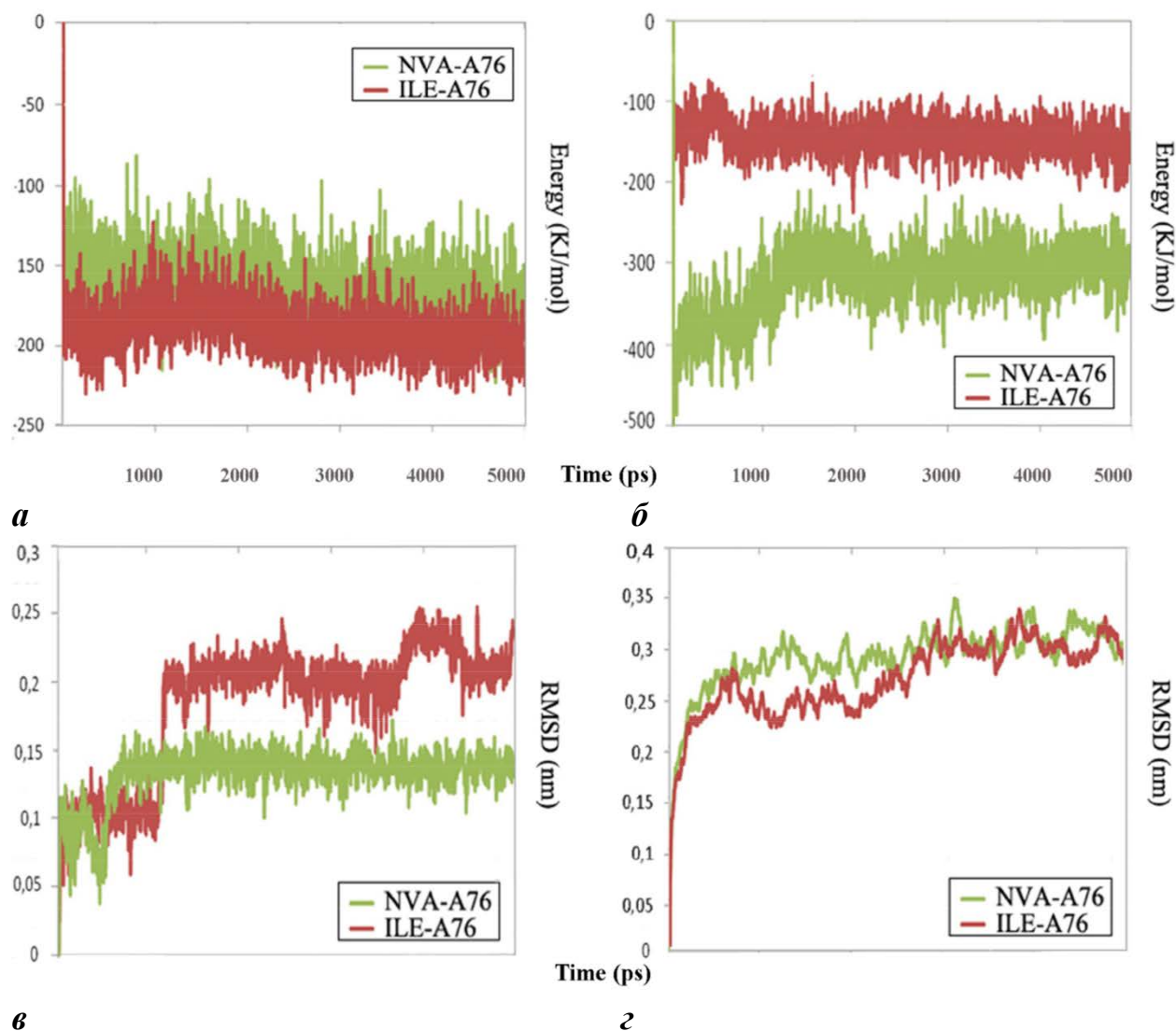


Рис. 6.2. Енергії коротких Леннард-Джонсоновських (*a*) та кулонівських взаємодій (*б*) пост-трансферних лігандів із амінокислотами редагувального сайту, RMSD лігандів (*в*) та RMSD всього комплексу білка із тРНК (*г*)

RMSD всього комплексу показує, на даному етапі системи знаходиться в рівноважному стані і не можуть впливати на зв'язування фрагментів аміноацил-тРНК. У таблиці 6.1 вказані взаємодії між білком та частинами ліганда, а також активні групи, які безпосередньо беруть участь у апроцесі. Ці результати були отримані за допомогою функції `g_dist` пакету Gromacs та власного скрипту на мові Python. Два водневих зв'язки, утворені між бічним

ланцюгом Asp347 і NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-групою та OH-групою Thr247 і CO-групою у комплексі із Pe-A76, формувалися значно рідше, ніж у комплексі із Nva-A76 (табл. 6.1). (Таблиця містить інформацію про водневі зв'язки, які зберігаються протягом щонайменше 40% аналізованого періоду після 1 нс).

Таблиця 6.1

**Час існування водневих зв'язків між субратами та редагувальним активним центром LeuRStt**

Учасники взаємодії	Nva-A76 (WT)	Pe-A76 (WT)
Leu329 головний ланцюг CO – NH аденозину	1.00	1.00
Leu329 головний ланцюг NH – NH аденозину	0.158	0.153
Tyr332 головний ланцюг CO – NH аденозину	0.842	0.847
Asp344 бічний ланцюг O <sup>-</sup> – NH <sub>3</sub> ліганду	0.081	0.214
Asp347 бічний ланцюг O <sup>-</sup> – NH <sub>3</sub> ліганду	1.00	0.56
Met338 головний ланцюг CO –NH <sub>3</sub> ліганду	0.98	0.81
Thr247 бічний ланцюг OH – CO ліганду	0.99	0.74
Thr248 бічний ланцюг OH– 3'-НО ліганду	0.94	0.79
Thr247 бічний ланцюг OH –3'-НО ліганду	1.0	0.9

Наявність молекули тРНК викликає певні зміни в загальному стані системи через напругу, яка виникає в ланцюзі РНК, рух доменів (С-домен, каталітичний домен, CP1), і, безумовно, ця ситуація впливає на положення молекули аміноацилу. Крім того, 3'-кінцевий стовбур тРНК не утворює жодних водневих зв'язків, крім А76, який є частиною аміноацилу. Графіки (рис. 6.2, в та 6.2, з) демонструють різницю в коливаннях енергії електростатичних взаємодій та RMSD для обох лігандів. На підставі цих результатів можна стверджувати, що Nva-A76 сильніше зв'язується із сайтом редагування, ніж Pe-A76.

Для розуміння механізму пост-трансферного гідролізу та специфічності відповідних пост-трансферних субстратів ми вивчили розташування та контакти молекул води. На малюнку нижче (рис. 6.3) показано вирівнювання декількох кадрів на протязі всієї МД, в якому молекули води присутні в необхідному положенні для атаки на карбонільну групу Nva-A76 та відсутність молекул води на протязі всієї молекулярної динаміки біля молекули Pe-A76.

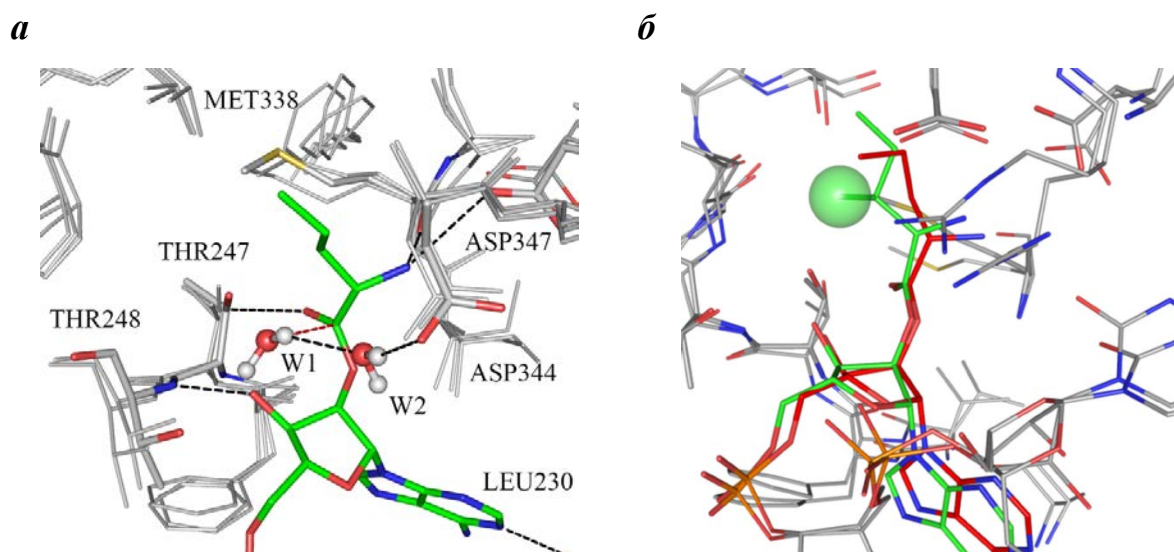


Рис. 6.3. Тривимірне зображення зрізів динаміки Nva-A76 із CP1 доменом *LeuRSTt* в присутності молекул води (а). Стеричні передумови бар'єру для води, стореного розгалуженим ланцюгом ізолейцину (показано зеленою сферою на зеленій молекулі Pe-A7 (б) та відсутність водневих зв'язків між ізолейциновою частиною аміноациладенілату та амінокислотами сайту. Червоним показано вихідну структуру Nva-A76 після докінгу (б)

У моделі нуклеофільної гідролітичної реакції кисень молекули води підходить до карбонільного вуглецю під кутом Бюргі-Дуніца, який приблизно дорівнює  $95-105^\circ$  [95]. Наступною вимогою для реакції гідролізу є те, що молекула води повинна бути активована, наприклад, за допомогою Asp344, Asp347 або Thr248 (рис. 6.4). Такі молекули води повинні бути стабільними,

або вони можуть бути змінені іншою молекулою під час руху розчинника в процесі динаміки, що забезпечить достатній час для реакції.

В результаті протікання першої стадії утворюється проміжний продукт, коли гідроксильний аніон атакуючої молекули води (W1) приєднується до вуглецю, що зв'язаний із 2'-О тРНК, а протон через асистуючу 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. Потрібно також сказати, що заміна 3'-ОН групи на водень робить неможливим протікання реакції взагалі за цим механізмом, оскільки 3'-ОН група приймає пряму участь в даному процесі. Це також підтверджується експериментальними даними. На системі LeuRS *E.coli* методами швидкої кінетики показано, що заміна 3'-ОН групи тРНК на водень призводить до 10000 кратного падіння редагуючої активності фермента [90].

Наші результати моделювання показують, що одною із причин того, що реакція гідролізу Pe-A76 перебігатиме набагато повільніше може бути розгалужений бічний ланцюг, який не дозволяє молекулам води наблизитися. Вирівнювання лігандів протягом динаміки показало подібне розташування як Nva-A76, так і Pe-A76. Однак, у випадку з Pe-A76, метильна група виступає з кишені, створюючи таким чином стеричну перешкоду для розчинника. Так, інтерпретація значення прорахованої частоти існування молекули води в необхідному місці може запропонувати пояснення для більшої вірогідності пост-трансферного редагування норваліну у порівнянні з ізолейцином (приблизно в 10 разів), що було показано експериментально [87].

**6.2.2. Аналіз мутації Asp347Ala в CP1 домені *LeuRS<sub>Tt</sub>*.** Мутація консервативної аспарагінової кислоти (Asp347 в *LeuRS<sub>Tt</sub>*) суттєво впливає на пост-трансферне редагування [89, 96, 97]. Для підтвердження достовірності наших попередніх розрахунків та кращого розуміння структурних передумов

селективності у відборі амінокислот в редагувальному домені ми створили мутантну систему *LeuRStt* (*Asp347Ala*) і провели 5 нс молекулярну динаміку із використанням як *Nva-A76*, так і *Pe-A76* в якості субстрату.

Ефект мутації *Asp347Ala* на зв'язування *Nva-A76* був проаналізований шляхом підрахунку міжмолекулярних водневих зв'язків та енергії кулонівських взаємодій, в результаті чого в отримано усереднені значення 6,12 (9,1 для дикого типу) та -173,7 кДж/моль (-355,3 кДж/моль для дикого типу) відповідно. Однак для *Pe-A76* ці значення трохи відрізнялися. Середня кількість водневих зв'язків становила 5,8 (7,3 для дикого типу) і енергія кулонівських взаємодій зменшилася до -160,7 кДж/моль (-210,1 кДж/моль для дикого типу). Ці два аналізи показали, що мутація *Asp347* негативно впливає на активність домену *LeuRS*. У таблиці 6.2 перераховані можливі молекулярні взаємодії між мутантним білком та лігандами, їх частота та активні групи, що їх формують.

Таблиця 6.2

**Час існування водневих зв'язків між субстратами та редагувальним активним центром *LeuRStt***

Учасники взаємодії	<i>Nva-A76</i> (D347A)	<i>Pe-A76</i> (D347A)
<i>Leu329</i> головний ланцюг CO – NH аденозину	1.00	1.00
<i>Leu329</i> головний ланцюг NH – NH аденозину	0.122	0.141
<i>Tyr332</i> головний ланцюг CO – NH аденозину	0.88	0.86
<i>Asp344</i> бічний ланцюг O <sup>-</sup> – NH <sub>3</sub> ліганду	0.02	0.75
<i>Asp347</i> бічний ланцюг O <sup>-</sup> – NH <sub>3</sub> ліганду	N/A	N/A
<i>Met338</i> головний ланцюг CO –NH <sub>3</sub> ліганду	0.98	0.76
<i>Thr247</i> бічний ланцюг OH – CO ліганду	0.74	0.40
<i>Thr248</i> бічний ланцюг OH– 3'-НО ліганду	0.80	0.79
<i>Thr247</i> бічний ланцюг OH –3'-НО ліганду	1.0	0.83

Цікаво, що для мутанта Asp347Ala два водневих зв'язки, утворені між ОН групою Thr247 і СО- групою Pe-A76 та між NH групою Thr248 і 3'-ОН групою ліганду, мають дуже низький рівень зустрічаємості (стабільності), а саме 0,4 та 0,2 відповідно, у порівнянні із такими ж показниками для Nva-A76 (табл. 6.2).

Експериментальна робота Cvetic та її колег показала, що швидкість деацильовання мутантом молекули Pe-A76 в 21 раз нижче, ніж деацильовання Nva-A76 [87]. Проте в експериментах з мутагенезу як мутант Thr247Val, так і Thr248Val показали знижену активність, в першу чергу через значне зменшення каталітичної ефективності ( $k_{cat}$ ), тобто швидкості/частоти перебігу ферментативного каталізу незалежно від концентрації субстрату [68]. Це може свідчити про важливість таких елементів як ОН група бічного ланцюга Thr247 та NH групи основного ланцюга Thr248 для ініціації каталізу. З іншого боку, слід також зазначити, що у випадку з Pe-A76 відсутність у мутанті водневих зв'язків між  $\text{NH}_3^+$  групою ліганду та карбоксильної групою Asp347 може частково компенсується подібним зв'язком бічного ланцюга Asp344 із  $\text{NH}_3^+$  групою субстрату (табл. 6.2 та рис. 6.4).

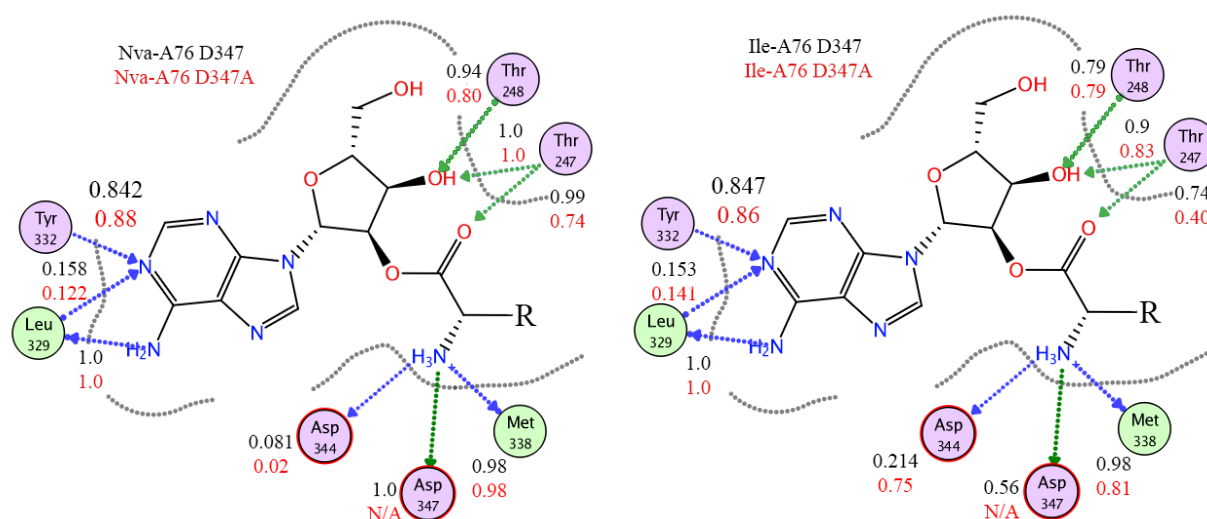


Рис. 6.4. Фармакофорні мапи зв'язків між аміноацил-тРНК та амінокислотами редагувального сайту та час їх існування в білках дикого та мутантного типу

Цей компенсаторний ефект пояснює експериментальні результати залишкової активності мутанта Asp347Ala у його високих концентраціях [46, 87]. Ефект мутації Asp347Ala на зв'язування Nva-A76 був проаналізований шляхом підрахунку міжмолекулярних водневих зв'язків та енергії кулонівських взаємодій, в результаті чого в отримано усереднені значення 6,12 (9,1 для дикого типу) та -173,7 кДж/моль (-355,3 кДж/моль для дикого типу) відповідно (рис. 6.5). Однак для Pe-A76 ці значення трохи відрізнялися. Середня кількість водневих зв'язків становила 5,8 (7,3 для дикого типу) і енергія кулонівських взаємодій зменшилася до -160,7 кДж/моль (-210,1 кДж/моль для дикого типу). Ці аналізи показали, що мутація Asp347 негативно впливає на активність домену LeuRS.

Важливою особливістю такого мутованого зв'язувального сайту є відсутність жорсткої орієнтації амінокислотного фрагмента аміноацилу. Як результат, ця модифікація визначає більш високий ступінь свободи для аліфатичного ланцюга Nva і Pe і, безсумнівно, створює більшу кількість можливих конформацій. Така релаксація може спричинити певні зміни кутів обертання карбоксильної групи і тому молекула води може наблизитися і атакувати карбоксилат (рис. 6.5). Тим не менш, ймовірність цього процесу все ще занижка (у порівнянні із білком дикого типу). Це припущення підтверджується двома наступними спостереженнями. Перше спостереження стало результатом кластеризації білково-лігандних структур, отриманих в результаті моделювання МД, що показало більшу нестабільність ліганду через відсутність карбоксильної групи Asp347.

Друге спостереження позначило неможливість довготривалого розташування H<sub>2</sub>O під кутом Бюргі-Дуніца до площини COO-групи (приблизно 1-2 пс на кожну молекулу води, що відповідає редагувальному стану). 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 величин) як для Nva-tRNA<sup>Leu</sup>, так і для Ile-tRNA<sup>Leu</sup> [94]

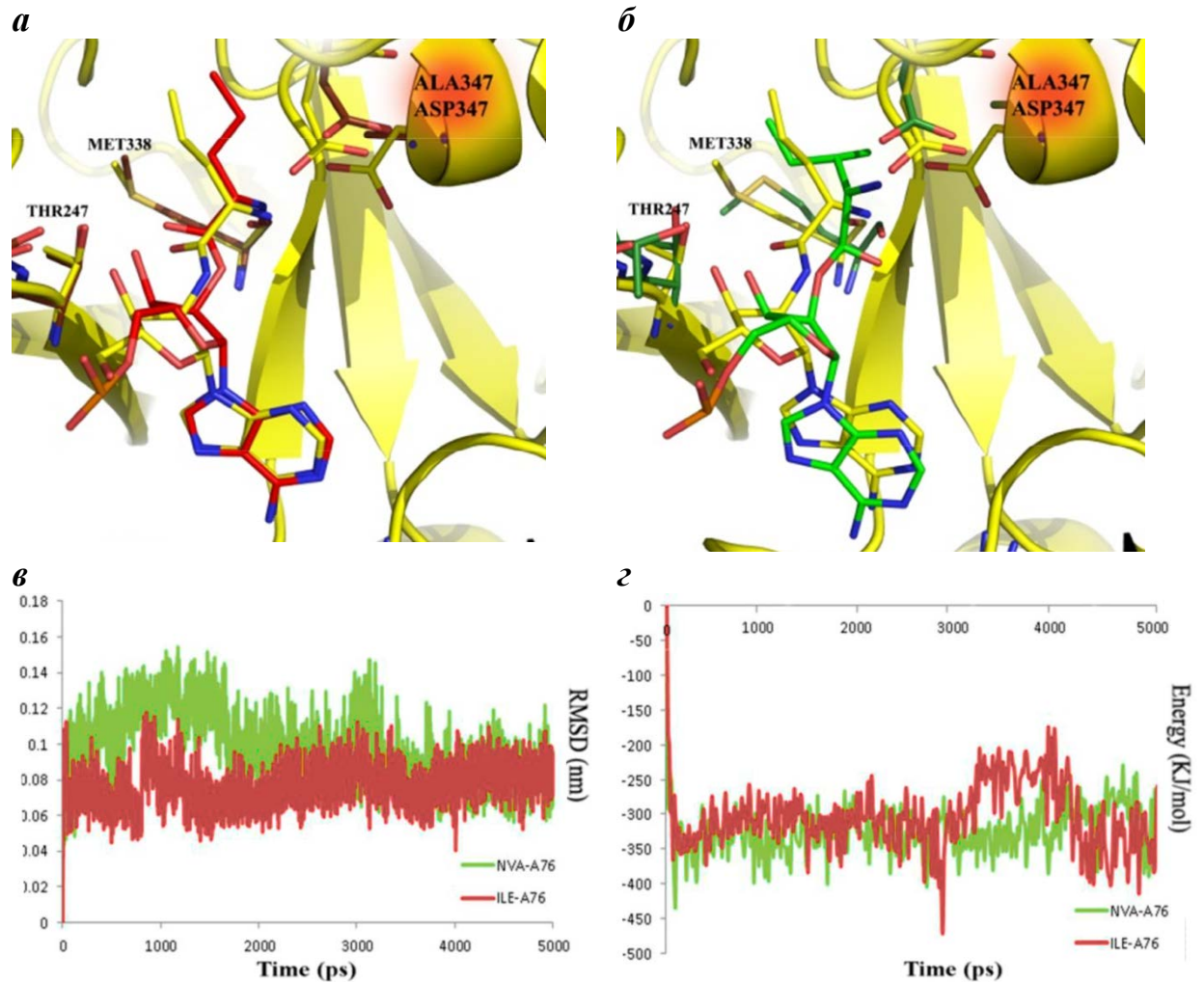


Рис. 6.5. Імовірний механізм ефекту мутації Asp347Ala, яка впливає на конформацію Nva-аміноацилу, викликаючи зміни у розподілі сили зв'язування між амінокислотами сайту (зростаюча роль залишків 247, 248, 338 замість 344 та 347). Зникнення Asp347 призводить до дезорієнтації Nva-A76 (*a*) і наступної втрати доступу молекул води. Так Ile-A76 втрачає зв'язок через карбонільну групу (*б*) та відчиняє вікно для атаки, із одночасною фіксацією через Asp344. Результати аналізу RMSD та електростатичних взаємодій представлені у вигляді графіків (*в*, *г*)



### 6.3. Вивчення редагувального домену LeuRS із *P. horikoshii*

Перш за все було змодельовано комплекс архейної LeuRS з tRNA<sup>Leu</sup> із *P. horikoshii*, де акцепторний кінець тРНК зорієнтований безпосередньо у сайт редагування. Далі ми досліджували механізм редагування проти пост-трансферного субстрату в архейній системі. Всі гіпотези були сформовані на підставі кристалографічних даних комплексу LeuRS*Tt* з аналогом норваліну (Nva-A76) як кандидатом у субстрати для механізму пост-трансферного редагування (рис. 6.6).

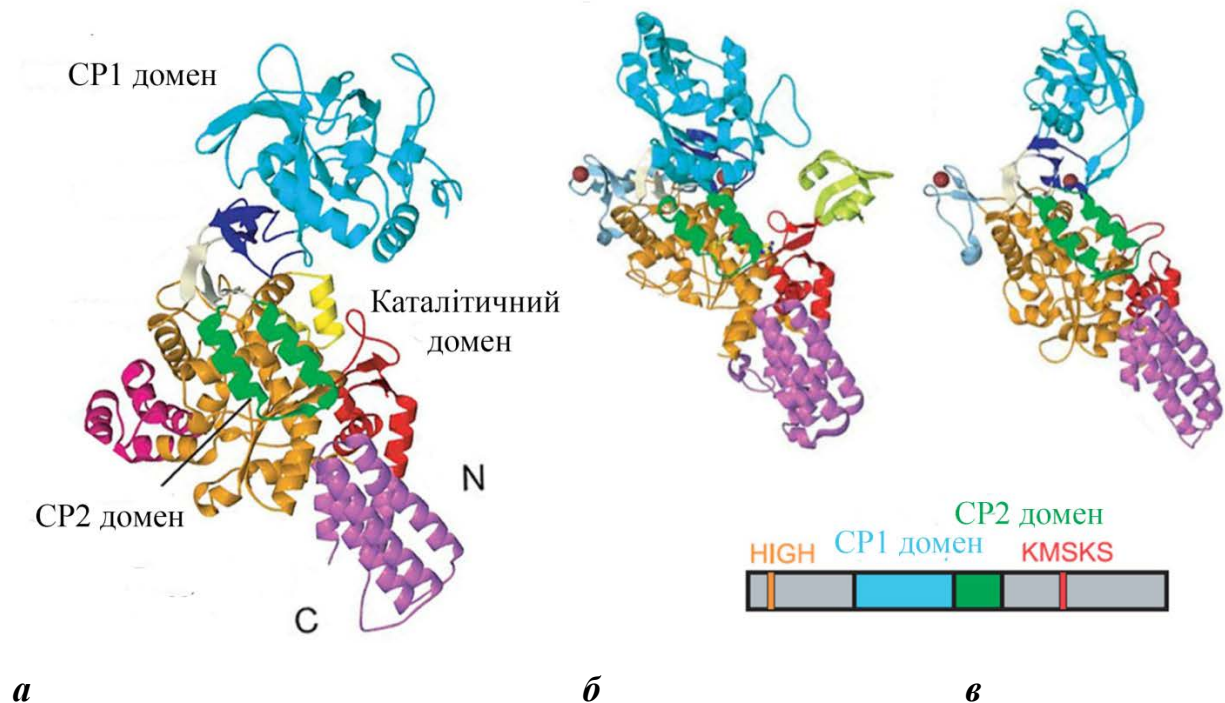


Рис. 6.6. Модульна структура LeuRS із *P. horikoshii* (*a*), LeuRS (*б*) та ValRS (*в*) із *T. thermophilus*. Домен Rossmann-fold (помаранчевий), сполучний пептид 1 (редагувальний домен CP1) (блакитний), шпилька CP1 (синій), сполучний пептид 2 (домен CP2) (зелений), ядро CP (білий), ділянка контакту із стовбуром (домен SC-fold) (червоний колір), домен представлений пучком  $\alpha$ -спіралей (пурпуровий) та лейцил-специфічні домени 1 (показані жовтим кольором). Узагальнена амінокислотна послідовність із картованими функціональними доменами показана нижній частині.

Для вивчення індивідуальних особливостей LeuRS із *P.horikoshii* (LeuRS $Ph$ ) було здійснено МД LeuRS із Nva-tRNA<sup>Leu</sup> та Ile-tRNA<sup>Leu</sup>. Нарешті, на основі отриманих даних було запропоновано можливий механізм процесу пост-трансферного редагування в архейній системі LeuRS, яка відрізняється від прокаріотичного типу.

**6.3.1. Моделювання комплексу LeuRS-tRNA<sup>Leu</sup> із *P.horikoshii* в редагувальному домені.** 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 субстрата, 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 APCазами інших видів. На цьому етапі було виявлено кілька спільних ознак у модульній архітектурі, а також відмінності у геометрії CP1 домену відносно каталітичної субодиниці. BLAST (основний інструмент локального вирівнювання) був виконаний для ідентифікації існуючих гомологів у базі даних UniProt [98]. Зрештою, домен CP1 із LeuRS *P.horikoshii* (PDB ID: 1WZ2) подібний на 36%, 31% та 31% до CP1 доменів LeuRS із *H.sapiens* (PDB ID: 2WFD), ValRS із *T.thermophilus* (PDB ID: 1GAX) і LeuRS із *C.albicans* (PDB ID: 2WFG), відповідно [99]. Незважаючи на низький рівень подібності, на рис. 6.7 представлено задовільне вирівнювання та порівняння областей CP1 із ValRS $Th$  та LeuRS $Ph$ .

Сервер FT-MAP визначив значну кількість можливих областей зв'язування ліганда на поверхні ферменту із *P.horikoshii*. Цей алгоритм виконує глобальний пошук областей, що можуть зв'язати ряд невеликих органічних молекул-зондів (наприклад, фенолу, ацетону, бензолу та циклогексану) по всій білковій поверхні. Обрізаний домен CP1 із LeuRS $Ph$

опрацьовувався сервером FT-MAP і виявив скупчення зондів, розташованих поблизу Thr229, Asp332, Asp314 та Asn317, а потім був структурно вирівняний проти кристалічної структури LeuRS із *C.albicans* (із бензоксаборол-АМР, зв'язаним у редагувальному домені) (рис. 5.7). В решті решт, всі залишки, що могли брати участь у зв'язуванні ліганду, були ідентифіковані і порівнювалися позиційно у тривимірних структурах. Результати перехресної перевірки показали, що механізми селективності та фіксації субстрату LeuRS $_{Ph}$  були подібні до тих, що вже продемонстровані в LeuRS $_{Tt}$ .

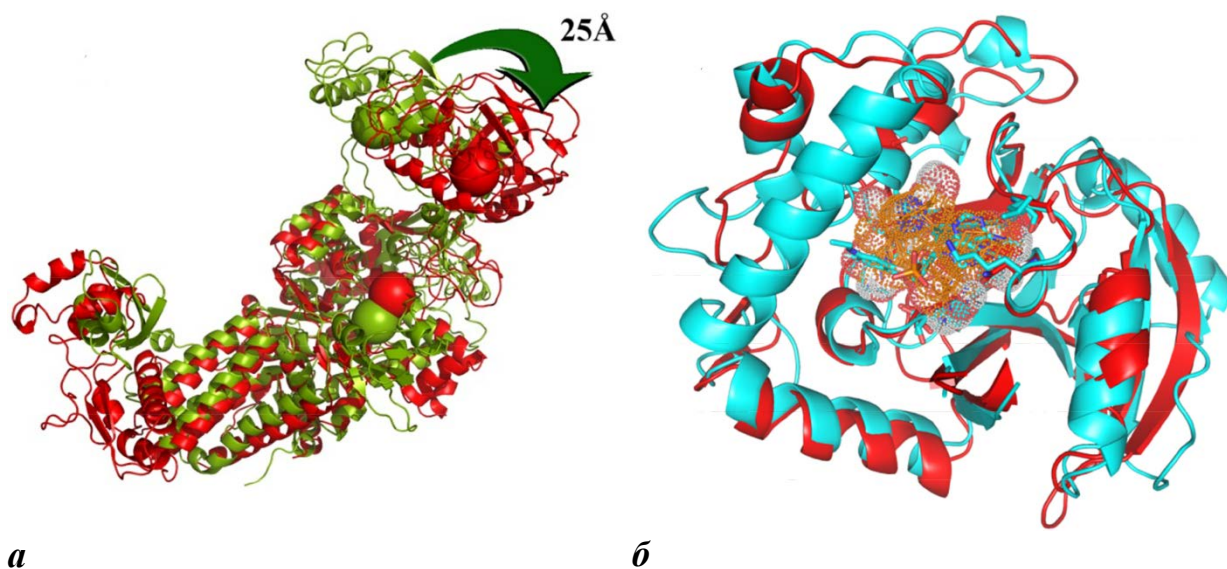


Рис. 6.7. На зображенні показано вирівнювання двох гомологічних структур LeuRS. Структури LeuRS із *P.horikoshii* (червоний) проти LeuRS із *T.thermophilus* (зелений) (а). Сайти аміноацилювання та редагування представлені сфери відповідного кольору. Порівняння поверхні сайту зв'язування редагувальних доменів LeuRS із *P.horikoshii* (червоним) та *C.albicans* (блакитним) із закристалізованим (блакитна стрижнева модель) лігандом (б)

Крім того, результати молекулярного докінгу Nva-A76 та Pe-A76 у CP1 домен LeuRS $_{Ph}$  були застосовані для побудови початкових структур для МД. Два комплекси з кращими позиціями субстратів, що формували взаємодії

аденозинової частини та аміногрупи аміноацилу із Asp314, Asn317 та Asp332, порівнювалися із кристалічними структурами домену CP1 із *T.thermophilus* ValRS (PDB ID: 1GAX) та LeuRS із *C.albicans* (PDB ID: 2WFG). Це вирівнювання показало подібне розташування пуринових основ та схожу орієнтацію аміногруп субстратів.

Після ідентифікації важливих залишків (тих, що відіграють роль у фіксації A76), на сервері HADDOCK виконувався гнучкий докінг молекули тРНК у синтетазу. Дві найкращі можливі форми (рис. 6.8) були обрані переважно за значеннями RMSD (кластеризація структур під час МД), показниками AIR, аналізом міжмолекулярних водневих зв'язків та аналізом гідрофобних контактів. Обидві конформації стебла були релаксовані в пакеті Gromacs, щоб потім збалансувати їх у процесі вільної МД протягом 100 нс. Для запобігання процесу переходу стебла тРНК в пре-трансферне спочатку використовувався режим керованої МД для стабілізації комплексів протягом першого періоду симуляції (30 нс), а пуринова основа A76 була зафіксована у сайті із дистанційними обмеженнями за допомогою моделі швидкості COM (Center of Mass), щоб стримувати невігідний рух кінцевого 3'-ССА тРНК. Таким чином, найбільш стійке положення A76 було знайдено в межах сайту і потім було зафіксовано біля Asp314 та Asn317 із використанням геометричних примушень. Після керованої молекулярної динаміки (30 нс) на початку вільної МД сила примушення (2000 кДж / моль на Å<sup>2</sup>) була вимкнута.

Обидві траєкторії Nva- та Ile-tRNA<sup>Leu</sup> із LeuRS<sup>Ph</sup> були проаналізовані, і найбільш стабільні (з точки зору частоти протягом МД) структури були сгруповані у 10 кластерів, які потім використовувалися далі в оцінці механізму пост-трансферного редагування.

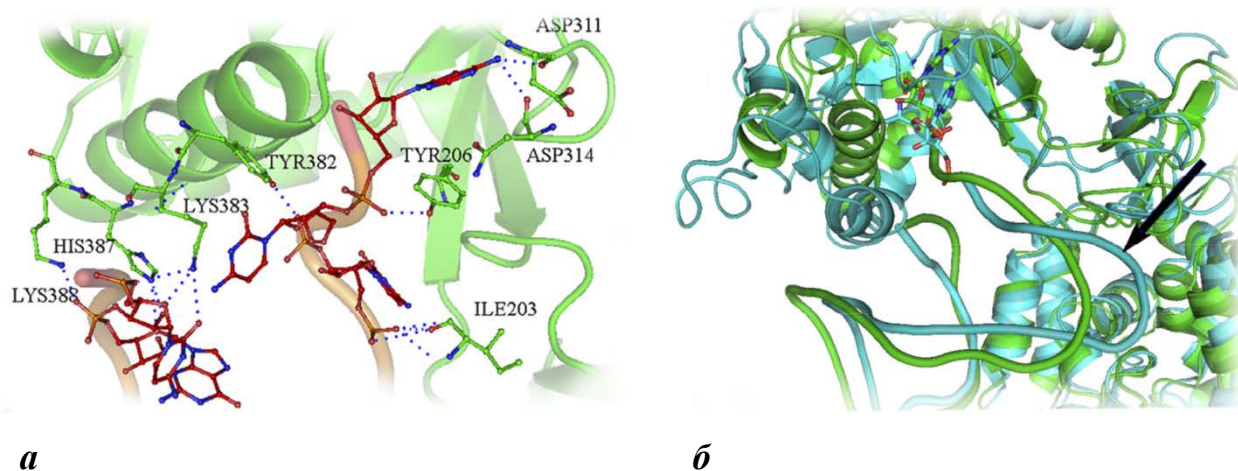


Рис. 6.8. Результати докінгу 3'-кінцевого стовбура тРНК, у вигляді стрічки/шнурка, спрямовані у сайт редагування *LeuRS<sup>Ph</sup>*. А) Рисунок демонструє конформацію акцепторного стебла тРНК, яка взаємодіє із білком сильними водневими зв'язками (а). Різні докінгові конформації однієї і тієї ж частини (нуклеотиди 73-80) ланцюга тРНК (б). Після МД, у дослідженні використовувалася більш стабільна (позначена зеленим) конформація. Інша конформація (позначена блакитним та чорною стрілкою) була деформована під час МД та втратила важливі взаємодії із білком. Критично деформована ділянка показана чорною стрілкою

**6.3.2. Зв'язування пост-трансферних субстратів і можливий механізм гідролізу помилково аміноацильованої тРНК в редагувальному домені *LeuRS<sup>Ph</sup>*.** Для демонстрації особливостей зв'язування пост-трансферних субстратів (*Nva*-A76 / *Leu*-A76) було проведено два різних моделювання. Комплекс повнорозмірних *LeuRS* із  $tRNA^{Leu}$  був попередньо врівноважений протягом 50 нс вільної МД. Конформації були кластеризовані, а найкращі докінгові конформації в комплексі із *LeuRS* були використані для розрахунку 5 нс динаміки. Як видно на рис. 6.8 3'-кінцевий стовбур тРНК утворює кілька важливих водневих зв'язків з лінкерною частиною *LeuRS* та доменом CP1. Стабільність моделювання МД була перевірена та підтверджена даними RMSD та порівнянням загальної енергії. Коливання RMSD були



стабілізовані для Nva-A76 незабаром після 2 нс, на відміну від Pe-A76 (рис. 6.9A).

Для вивчення сили зв'язування пост-трансферних субстратів з редагувальним сайтом було проаналізовано кількість міжмолекулярних водневих зв'язків та показано, що середнє значення для Nva-A76 це 7,3, а для Pe-A76 - 5,1. Найбільш стійкі зв'язки утворювалися із Met323, Asp332 та Lys398. Значення кулонівстких взаємодій між Nva-A76 та доменом CP1 було стабільним протягом 5 нс, і становило, в середньому, -352,1 кДж/моль, тоді як для Pe-A76 - рівень енергії кулонівської взаємодії не опускався нижче -175,3 кДж/моль (рис. 6.9). Графіки на рис. 6.9 демонструють відмінності між показниками RMSD та енергіями електростатичних взаємодій (кДж / моль) для Nva-A76 та Pe-A76.

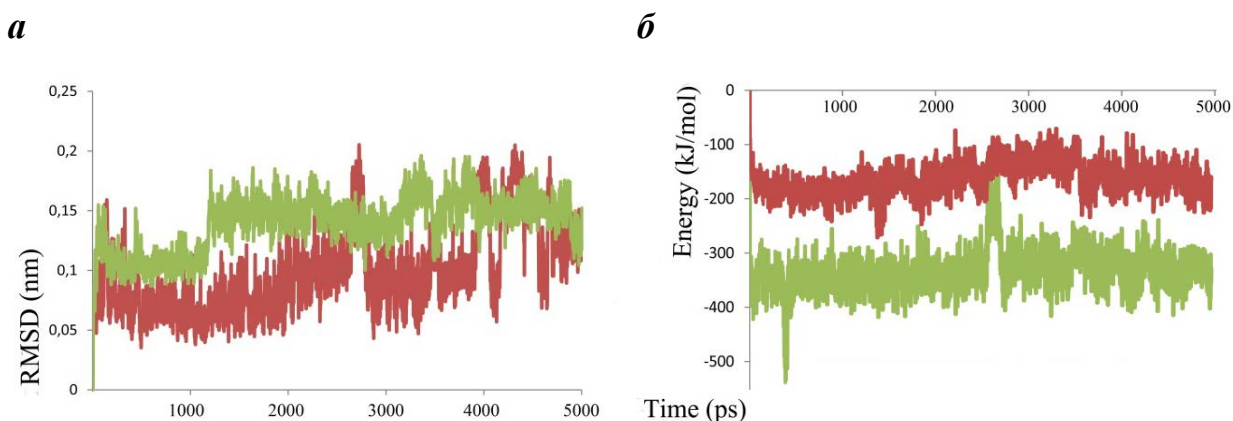


Рис. 6.9. RMSD структури ліганду (а) та енергії електростатичної взаємодії із білком, *LeuRSPH* (б). Зеленим кольором позначено графіки Nva-A76, червоним - Pe-A76

. Для гідролізу ефірного зв'язку між неправильною амінокислотою та тРНК молекула води повинна бути активована для проведення нуклеофільної атаки на карбонільний вуглець складного ефіру. Для виявлення можливих атакуючих молекул води були проаналізовані всі стани лігандно-білкового комплексу із водним оточенням. Варто зазначити, що лише стабільні молекули води (у тому числі ті, які не зміщувалися протягом більше 20 пс) включалися

до результуючого стану, що аналізувався. Крім того, було показано, що кількість води поблизу Nva-A76 протягом 5нс була в 10 разів вище, ніж у аналогічній системі біля Pe-A76. Комплекс аміноацил-tPHK (Nva-A76 / Pe-A76) перевірявся щодо відповідної геометрії між киснем води та карбоксильною групою і стабільністю цієї геометрії.

Найбільш ймовірна теорія нуклеофільної атаки підтверджує, що молекула води може атакувати карбоксильний вуглець після активації атомами найближчих залишків або 3'-ОН групою A76 tRNA<sup>Leu</sup>. Одним з критеріїв для цієї реакції є відстань менше 3.5Å. Серед усіх проаналізованих молекул води (навколо каталітичного майданчика) одна виявилась найближчою до карбонільного вуглецю норваліну. Атомна відстань 3,1 Å між киснем води та атомом карбонілу аміноацилу дозволяє припустити, що ця молекула води діє як нуклеофіл у реакції редагування. Інші критерії стосуються орієнтації молекули води відносно площини карбоксильної групи. Таким чином, атоми аміногрупи, карбоксильної групи і С-альфа можуть утворювати площину, а сприятливий кут для молекули води дорівнює 103° (рис. 6.10, а). 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 Н-зв'язок з найближчою молекулою води W2 (допоміжною, або асистуючою молекулою води), яку можна було активувати консервативним Thr234 (рис. 6.10, б).

Отже, результати наших МД показали, що Pe-A76 займає те саме місце та орієнтацію, що й Nva-A76, але розгалужений боковий ланцюг перешкоджає наближенню молекул води, і тому реакція гідролізу значно затримується. В Pe-A76 метильна група експонується із кишені, що створює стеричну перешкоду для розчинника. Жодна з молекул води поблизу Pe-A76 не утворювали взаємодії з білками або іншими молекулами води.

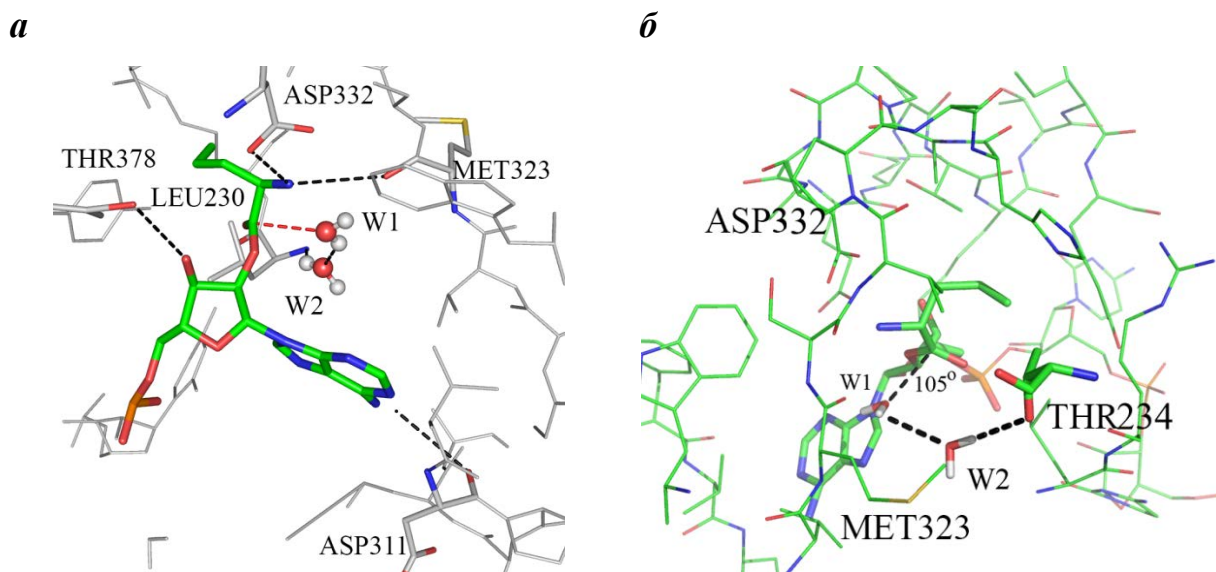


Рис. 6.10. Запропонований механізм нуклеофільної атаки молекулою води (W1) на карбонільний вуглець Nva-A76 та утворення водневих зв'язків із навколишніми амінокислотами (а) і демонстрація активації води через Thr234 з іншого ракурсу (б)

Цікаво, що у випадку *LeuRSP<sub>h</sub>* молекула атакуючої води підходить до субстрату з боку Met323, тоді як у випадку *LeuRST<sub>t</sub>* [75, 88] молекула води підходить з протилежної сторони – з боку Asp344 (Ala329 у *LeuRSP<sub>h</sub>*). Можливо, це пов'язано із деякими відмінностями в структурі активних центрів редагувальних доменів прокаріотичних та еукаріотичних/архейних ферментів. Це, в свою чергу, обумовлено деякими відмінностями в первинній структурі обох ферментів у ділянці, що відповідає структурі редагувального сайту. Наприклад, залишок Thr248 із *LeuRST<sub>t</sub>*, що зберігається в прокаріотичних *LeuRS*, замінюється на Leu230, а Asp344 в *LeuRST<sub>t</sub>* замінюється Ala або Ser в *LeuRS* архей та еукаріотів [100].

### Підсумки:

1. Побудовано дві моделі різних комплексів аміноацил-тРНК (Nva- та Pe-tRNA<sup>Leu</sup>) із *LeuRST<sub>t</sub>* дикого типу та із його мутантом Asp347Ala.



2. Проведено та проаналізовано молекулярну динаміку комплексів, що показали переваги у зв'язуванні Nva-A76 відносно Ile-A76 та продемонстрували як розгалужений бічний ланцюг ізолеїцину заважає наближенню води.

3. За допомогою МД мутантного білка (заміна Asp347Ala) продемонстрована особлива роль ОН групи Thr247 та NH групи Thr248 у зв'язуванні ліганду LeuRS $t_t$ .

4. Створена модель LeuRS із *P.horikoshii* в комплексі із tRNA<sup>Leu</sup> у сайті редагування.

5. Продемонстровано, що Leu230 в LeuRS $Ph$  відповідають за утворення водневого зв'язку із 3'ОН рибози аміноацилу, замість Thr247 в LeuRS $t_t$ .

6. За допомогою аналізу водного оточення визначено, що гідроліз Nva-A76 переважає над гідролізом Ile-A76 під час редагування.

Матеріали досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

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.

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.

## РОЗДІЛ 7

### УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Реакція аміноацилювання лейцину молекулою LeuRS, є дуже складною і унікальною через специфіку активного сайту, організацію доменів та особливості субстрату. Сам факт існування додаткового механізму редагування CP1 доменом не пояснює селективність амінокислот під час аміноацилювання. Тому, щоб вивчити структурні основи селективності амінокислот у аміноацилювальному сайті LeuRS $Tt$  і показати картину зв'язування пре-трансферних субстратів ми використовували молекулярні докінг та динаміку. Це дозволило виявити ряд особливостей цього процесу та запропонувати деякі причини відсіву неправильних субстратів за формою, розміром і гнучкістю радикалів. Використовуючи на першому етапі оціноні значення двох функцій при докінгу амінокислот та AMP, було отримано дані про конформацію лігандів, які добре корелюють із експериментальними результатами. Дані по моделюванню показали, що відмінності в жорстких каркасах ізoleyцину та його великій площі поверхні призводять до більш низької електростатичної взаємодії із активним сайтом ферменту порівняно із норваліном та лейцином. Експериментальні та наші дані показали, що норвалін, а також лейцин є значно вірогіднішими субстратами в реакції активації порівняно із ізoleyцином. Подальше вивчення аміноациладенілатів показало, що зниження ступеня активації деяких амінокислот може бути викликане двома причинами: надмірною гнучкістю, розміром або структурою та швидким гідролізом проміжного субстрату завдяки нуклеофільній атаці молекул води. Перший стосується невеликих залишків цистеїну або валіну, а другий можна пояснити рухом Tyr43 у відповідь на внутрішні напруження

деяких аміноациладенілатів. Таким чином, Tyr43, що захищає Leu-AD та Nva-AD від гідролізу водою вже не зможе цього зробити в повній мірі це для таких пре-трансферних субстратів, як Hcys- та Ile-AD. Пройшовши перше «сито» у аміноацилюючому сайті молекули аміноацилів переносяться на тРНК, після чого вони потрапляють в редагувальний домен для повторної перевірки.

Перед проведенням основних досліджень пост-трансферного редагування молекул Nva-tRNA<sup>Leu</sup> та Ile-tRNA<sup>Leu</sup> було перевірено метод підготовки неканонічних залишків на двох системах лейциновій і проліновій з різних організмів, спираючись на експериментальні дані. На даному етапі проводилась молекулярна динаміка з використанням двох відомих методів параметризації аміноацил-тРНК, проста комбінація топологій амінокислоти та нуклеотидного залишку та R.E.D.III метод визначення розподілу зарядів.

LeuRS є характерним представником APCаз I класу, який аміноацилює 2'OH атом рибози та має здатність пост-трансферного редагування. Зазвичай лейцил-тРНК не має гідролізуватись у редагувальному домені CP1 дикого типу (WT). Але мутація T252A в цьому домені збільшує ймовірність такої події, дозволяючи зв'язувати лейцил- та ізолейкецил-тРНК з її подальшою дисоціацією на вихідні компоненти реакції аміноацилювання [81, 82]. На сьогодні механізм гідролізу аміноацил-тРНК позиціонується як двоступенева реакція. На першому етапі гідролізована молекула повинна приймати правильну геометрію - дві пари водневих зв'язків (Thr247 з карбонільним киснем / Asp347 з аміногрупою амінокислоти) стабілізуються і активують карбонільну групу. Після цього молекула води (W1) повинна атакувати активований карбонільний вуглець, одночасно активуючись іншою молекулою води (W2). При цьому утворюються водневі зв'язки з оточуючими амінокислотами сайту зв'язування. Для симуляції лейцил-тРНК у стані пост-трансферного редагування ми використовували білок дикого типу та мутант T252A і R.E.D.III процедуру визначення зарядів та альтернативний метод простого поєднання топології, описаний у статті Nagivara et al. [75]. В

результаті аналізу траєкторій було показано, що наявність молекул води геометрія аміноацилу, отримана за допомогою алгоритму R.E.D.ІІІ, краще відповідає вимогам реакції, відповідно до опублікованих біохімічних даних.

Нещодавно було показано, що саме на норвалін (але не ізолейцин або валін) спрямована редагувальна функція як бактеріальних (*E.coli*) [46], так і еукаріотичних LeuRS (*S.cerevisiae*) [99]. Таким чином, це еволюційно обумовлена селективність LeuRS. Слід зазначити, що LeuRS це єдина відома синтетаза, у якій пост-трансферне редагування спрямоване проти непротеїногенної амінокислоти. Структурна передумова селективності CP1 домену LeuRS досі залишається невивченою. Тому в даному дослідженні ми використовували методи МД для визначення того фактору, який зумовлює швидший гідроліз Nva-tRNA<sup>Leu</sup> порівняно з Ile-tRNA<sup>Leu</sup> у CP1 домені бактеріальної LeuRS з *T.thermophilus*. Для цього було побудовано чотири моделі, проведено молекулярну динаміку комплексів та проаналізовано результати. Здатність обох субстратів зв'язуватись із сайтом редагування була перевірена шляхом порівняння енергій взаємодій ліганду із амінокислотами сайту та підрахунку кількості міжмолекулярних водневих зв'язків. Результати показали, що субстрат Nva-A76 зв'язується міцніше, ніж Ile-A76. З іншого боку, наша симуляція показала ще одну можливу причину різної швидкості гідролізу для Nva-tRNA<sup>Leu</sup> та Ile-tRNA<sup>Leu</sup> у CP1 домені LeuRS. Моделювання МД показує, що розгалужений бічний ланцюг Ile-A76 стерично перешкоджає наближенню атакуючої молекули води, що призводить до значного зниження швидкості гідролізу.

Молекулярна динаміка мутанту LeuRSTt із критичною для реакції редагування заміною Asp347Ala, дозволила виявити цілу низку цікавих структурних відмінностей у зв'язуванні Nva- та Ile-tRNA<sup>Leu</sup> із активним центром редагувального домену LeuRS, що може впливати на селективність під час гідролізу цих субстратів. У випадку Ile-tRNA<sup>Leu</sup> частота утворення

водневих зв'язків, між гідроксилом бічного ланцюга Thr247 і карбоксильною групою ліганду та між NH основного ланцюга Thr248 і 3'-ОН групою лігандів набагато нижче, ніж у Nva-A76. Така сама, але менш виразна тенденція спостерігається і при утворенні зв'язків між ОН- групою бічного ланцюга Thr247 та СО- групи ліганда і між NH- групою основного ланцюга Thr248 та 3'-ОН групою ліганду. Загалом, ці результати підтверджують результати подвійного мутагенезу LeuRS і, оскільки мутації Thr247 та Thr248 переважно впливають на  $k_{cat}$ , також можна припустити, що ці два елементи можуть бути включені в каталіз реакції гідролізу [68]. Однак слід звернути увагу на важливу відмінність ролі Thr248 в структурній компоненті гідролітичної реакції, запропонованої Nagiawara et al. з одного боку [75], а також біохімічними даними та нашими даними молекулярної динаміки, з іншого боку. У механізмі, представленому японською групою, під час процесу гідролізу Val-tRNA<sup>Leu</sup>, бічна ОН-група Thr248 зв'язується із 3'-ОН групою тРНК, а A76 і відіграє важливу роль ініціатора реакції [75]. У той же час, Mursinna та його колеги показали, що пост-трансферна редагувальна активність мутанта Thr248Ala у LeuRS падає лише в 1,5 рази по відношенню до активності ферменту дикого типу [100]. Останнім часом ці результати були підтверджені шляхом вивчення передстаціонарної фази деацилювання методом кінетики одного обороту реакції. І накінець, ці результати також узгоджуються з нашими даними моделювання МД та підтримують гіпотезу про те, що час існування зв'язків між ОН бічного ланцюга Thr248 і 3'-ОН ліганда не змінюється для обох типів субстратів, які гідролізуються з різною швидкістю. У нашій моделі 3'-ОН група A76 tRNA<sup>Leu</sup> та ОН- група бічного ланцюга Thr247 утворюють водневі зв'язки із карбонільною групою норваліну. Таким чином, наші дані вказують на те, що потрібно провести нові квантово-механічні розрахунки механізму пост-трансферного редагування LeuRS<sup>Tt</sup> з залученням двох молекул води, які б дозволили уникнути приведених протиріч.

Редагувальний домен може бути еволюційним доповненням до аміноацилювального каталітичного домену IleRS, ValRS та LeuRS [2]. Функціональні аспекти механізму редагування у прокаріотичних APCаз класу 1A вже досить широко вивчені, а для LeuRSTt [2, 23, 25, 27, 28, 75, 87] вже навіть запропоновано механізм гідролізу неправильно ацильованої тРНК. Проте еукаріотичні та архейні APCази цього підкласу не вивчаються в тій же мірі.

У цьому дослідженні була створена модель архейної LeuRS із *P.horikoshii* в комплексі із tRNA<sup>Leu</sup>, де акцепторний стовбур тРНК був напрямлений у сайт редагування. Аналіз структури LeuRSPh показав доменну організацію спільну із групою LeuRS, ValRS та IleRS із *T.thermophilus*. Більш того, CP1 домен складається із аналогічних структурних елементів, що і ті, що виявлені в LeuRS із *C.albicans* і *H.sapiens*. Взагалі, сайт редагування LeuRS із *P.horikoshii* має багато спільного із ортологічними доменами бактеріальних LeuRS. На підставі цих висновків були отримані конформації субстратів пост-трансферного редагування, Nva-A76 та Ile-A76, у сайті редагування LeuRSPh. Незважаючи на різницю у взаємодіях між tRNA<sup>Leu</sup> та ферментами із *T.thermophilus* та *P.horikoshii*, зв'язування пост-трансферного субстрату є досить подібним. Як і у випадку бактеріальної LeuRSTt [87],  $\alpha$ -аміногрупа норваліну утворює H-зв'язки із карбоксильною групою Asp332 (Asp347 в LeuRSTt). Наступним важливим фіксатором субстрату в LeuRSTt виступають Thr247 і Thr248, консервативні елементи багатих треоніном мотивів ферментів бактерій.

Щоб дослідити можливий механізм реакції пост-трансферного редагування у LeuRSPh, молекули води були локалізовані поблизу карбонільної групи амінокислоти, яка мала бути гідролізована. За позицією атомів водню та кутом наближення до карбонільного вуглецю було обрано дві молекули, що відповідали усім критеріям відбору. Одна із них (W1), молекула атакуючої води, здатна здійснити атаку на електрофільну карбонільну групу

для гідролізу ефірного зв'язку. Молекула атакуючої води підходить до субстрату із протилежної сторони, ніж у випадку *LeuRSTt* [75]. Ця молекула води формує Н-зв'язки з другою молекулою (W2), утворюючи містки із Н-зв'язок із залишком Thr234. Друга молекула води може теж брати участь у процесі та ще більше полегшити гідроліз. Участь двох молекул води у гідролізі помилкового продукту було запропоновано нами також для механізму пост-трансферного редагування ProRS [73]. Механізм редагування у *LeuRSPh* відрізняється від подібного у *LeuRSTt*, редагувальний сайт якої може працювати із залученням нового гібридного рибозим/білкового каталізатора для виключення помилково активованих tRNA<sup>Leu</sup>. У моделі для *LeuRSTt* було запропоновано, що 3'-ОН-груп кінцевого A76 tRNA<sup>Leu</sup> активує молекули води, а отже, приймає участь у розщеплення ефірного зв'язку [75]. У той же час, у моделі *LeuRSPh* 3'-ОН-група кінцевого A76 знаходиться на відстані більше 3.5 Å від атакуючої молекули води. Тобто, у випадку *LeuRSPh* поки що не показано, що 3'-ОН-група кінцевого A76- tRNA<sup>Leu</sup> приймає безпосередню участь у реакції гідролізу.

Для вивчення молекулярних основ субстратної селективності у сайті редагування *LeuRSPh* було використано МД повнорозмірних комплексів LeuRS із Nva-tRNA<sup>Leu</sup> та Ile-tRNA<sup>Leu</sup>. Результати МД показали, що пост-трансферний субстрат Nva-A76 зв'язується сильніше, за Ile-A76. Запропонований вище механізм гідролізу відповідає ситуації із редагуванням Nva-A76, яка вважається головним (відповідним) пост-трансферним субстратом для LeuRS. В той же час, Ile-A76 зв'язується менш сильно із редагувальним сайтом і менш відкрита для молекул води, що робить цей субстрат менш придатним для гідролізу. Ці результати корелюють із біохімічними даними по бактеріальній LeuRS із *E.coli*, коли швидкість гідролізу аміноацил-тРНК, вимірювана методом вимірювання одного оборота реакції (single-turnover) для Nva-tRNA<sup>Leu</sup>, на порядок перевищувала швидкість для Ile-tRNA<sup>Leu</sup> [87].

## 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 LeuRSt 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 прокариотичного і архейного походження. Визначено роль залишків Asp347, Thr247, Thr248 (LeuR*Stt*) або Asp332, та Leu230 (LeuR*SPh*) 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 LeuR*Stt*, і для LeuR*SPh*. При цьому відрізняються ці процеси у LeuR*Stt* і LeuR*SPh* просторовою орієнтацією молекул води.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Ibba M, Soll D. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:617-50.
2. Yadavalli SS, Ibba M. Quality control in aminoacyl-tRNA synthesis: its role in translational fidelity. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2012;86:1-43.
3. Lee N, Bessho Y, Wei K, Szostak JW, Suga H. Ribozyme-catalyzed tRNA aminoacylation. *Nat Struct Biol.* 2000 Jan;7(1):28-33.
4. Rodin SN, Ohno S. Two types of aminoacyl-tRNA synthetases could be originally encoded by complementary strands of the same nucleic acid. *Orig Life Evol Biosph.* 1995 Dec;25(6):565-89.
5. Delarue M, Moras D. The aminoacyl-tRNA synthetase family: modules at work. *Bioessays.* 1993 Oct;15(10):675-87.
6. Eriani G, Delarue M, Poch O, Gangloff J, Moras D. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature.* 1990 Sep 13;347(6289):203-6.
7. Rossmann MG, Moras D, Olsen KW. Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature.* 1974 Jul 19;250(463):194-9.
8. Perona JJ, Rould MA, Steitz TA. Structural basis for transfer RNA aminoacylation by *Escherichia coli* glutaminyl-tRNA synthetase. *Biochemistry.* 1993 Aug 31;32(34):8758-71.
9. First EA, Fersht AR. Analysis of the role of the KMSKS loop in the catalytic mechanism of the tyrosyl-tRNA synthetase using multimutant cycles. *Biochemistry.* 1995 Apr 18;34(15):5030-43.
10. Cusack S, Berthet-Colominas C, Härtlein M, Nassar N, Leberman R. A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å. *Nature.* 1990 Sep 20;347(6290):249-55.
11. Schimmel P, Ribas de Pouplana L. Transfer RNA: from minihelix to genetic code. *Cell.* 1995 Jun 30;81(7):983-6.

12. Fukai S, Nureki O, Sekine S, Shimada A, Tao J, Vassylyev DG, Yokoyama 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. *Cell*. 2000 Nov 22;103(5):793-803.
13. Berman HM, Battistuz T, Bhat TN, Bluhm WF, Bourne PE, Burkhardt K, Feng Z, Gilliland GL, Iype L, Jain S, Fagan P, Marvin J, Padilla D, Ravichandran V, Schneider B, Thanki N, Weissig H, Westbrook JD, Zardecki C. The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2002 Jun;58(Pt 6 No 1):899-907.
14. Arnez JG, Moras D. Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends Biochem Sci*. 1997 Jun;22(6):211-6.
15. Yaremchuk A, Kriklivyi I, Tukalo M, Cusack S. Class I tyrosyl-tRNA synthetase has a class II mode of cognate tRNA recognition. *EMBO J*. 2002 Jul 15;21(14):3829-40.
16. Shen N, Guo L, Yang B, Jin Y, Ding J. Structure of human tryptophanyl-tRNA synthetase in complex with tRNA<sup>Trp</sup> reveals the molecular basis of tRNA recognition and specificity. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jun 23;34(11):3246-58.
17. Shitivelband S, Hou YM. Breaking the stereo barrier of amino acid attachment to tRNA by a single nucleotide. *J Mol Biol*. 2005 May 6;348(3):513-21.
18. Sprinzl M, Cramer F. Site of aminoacylation of tRNAs from *Escherichia coli* with respect to the 2'- or 3'-hydroxyl group of the terminal adenosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Aug;72(8):3049-53.
19. Kim SH, Quigley GJ, Suddath FL, McPherson A, Sneden D, Kim JJ, Weinzierl J, Rich A. Three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA: folding of the polynucleotide chain. *Science*. 1973 Jan 19;179(4070):285-8.
20. Giegé, R. and Eriani, G. (2009). Transfer RNA Recognition by Synthetases. In eLS, (Ed.). doi:10.1002/9780470015902.a0000531.pub2
21. Beuning PJ, Musier-Forsyth K. Transfer RNA recognition by aminoacyl-tRNA synthetases. *Biopolymers*. 1999;52(1):1-28.

22. Boyarshin K., Kriklivyi I., Yaremchuk G., Tukalo M. Pretransfer and posttransfer editing activity of prokaryote-type prolyl-tRNA synthetase of bacteria *Enterococcus faecalis* VII Parnas conference on biochemistry and molecular biology. The Ukrainian biochemical journal. 2009. V. 81, N 4, P. 159
23. Palencia A, Crépin T, Vu MT, Lincecum TL Jr, Martinis SA, Cusack S. Structural dynamics of the aminoacylation and proofreading functional cycle of bacterial leucyl-tRNA synthetase. Nat Struct Mol Biol. 2012 Jun 10;19(7):677-85.
24. Fukunaga R, Yokoyama S. Crystal structure of leucyl-tRNA synthetase from the archaeon *Pyrococcus horikoshii* reveals a novel editing domain orientation. J Mol Biol. 2005 Feb 11;346(1):57-71.
25. Tukalo M, Yaremchuk A, Fukunaga R, Yokoyama S, Cusack S. The crystal structure of leucyl-tRNA synthetase complexed with tRNA<sup>Leu</sup> in the post-transfer-editing conformation. Nat Struct Mol Biol. 2005 Oct;12(10):923-30.
26. Zhu B, Yao P, Tan M, Eriani G, Wang ED. tRNA-independent pretransfer editing by class I leucyl-tRNA synthetase. J Biol Chem. 2009 Feb 6;284(6):3418-24.
27. Lincecum TL Jr, Tukalo M, Yaremchuk A, Mursinna RS, Williams AM, Sproat BS, Van Den Eynde W, Link A, Van Calenbergh S, Grøtli M, Martinis SA, Cusack S. Structural and mechanistic basis of pre- and posttransfer editing by leucyl-tRNA synthetase. Mol Cell. 2003 Apr;11(4):951-63.
28. Fersht AR. Editing mechanisms in protein synthesis. Rejection of valine by the isoleucyl-tRNA synthetase. Biochemistry. 1977 Mar 8;16(5):1025-30.
29. Dulic M, Cveticic N, Perona JJ, Gruic-Sovulj I. Partitioning of tRNA-dependent editing between pre- and post-transfer pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases. J Biol Chem. 2010 Jul 30;285(31):23799-809.
30. Tan M, Zhu B, Zhou XL, He R, Chen X, Eriani G, Wang ED. tRNA-dependent pre-transfer editing by prokaryotic leucyl-tRNA synthetase. J Biol Chem. 2010 Jan 29;285(5):3235-44. doi: 10.1074/jbc.M109.060616. Epub 2009 Nov 23.

31. Pauling L (1957) Festschrift fuer Pr. Dr. Arthur Stoll, The probability of errors in the process of synthesis of protein molecules (Birkhauser, Basel), pp 597–602
32. Fersht AR, Dingwall C. Evidence for the double-sieve editing mechanism in protein synthesis. Steric exclusion of isoleucine by valyl-tRNA synthetases. *Biochemistry*. 1979 Jun 12;18(12):2627-31.
33. Nureki O, Vassylyev DG, Tateno M, Shimada A, Nakama T, Fukai S, Konno M, Hendrickson TL, Schimmel P, Yokoyama S. Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science*. 1998 Apr 24;280(5363):578-82.
34. Fukunaga R, Yokoyama S. Structural basis for substrate recognition by the editing domain of isoleucyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol*. 2006 Jun 16;359(4):901-12.
35. Sankaranarayanan R, Dock-Bregeon AC, Romby P, Caillet J, Springer M, Rees B, Ehresmann C, Ehresmann B, Moras D. The structure of threonyl-tRNA synthetase-tRNA(Thr) complex enlightens its repressor activity and reveals an essential zinc ion in the active site. *Cell*. 1999 Apr 30;97(3):371-81.
36. Dock-Bregeon A, Sankaranarayanan R, Romby P, Caillet J, Springer M, Rees B, Francklyn CS, Ehresmann C, Moras D. Transfer RNA-mediated editing in threonyl-tRNA synthetase. The class II solution to the double discrimination problem. *Cell*. 2000 Dec 8;103(6):877-84.
37. Sankaranarayanan R, Dock-Bregeon AC, Rees B, Bovee M, Caillet J, Romby P, Francklyn CS, Moras D. Zinc ion mediated amino acid discrimination by threonyl-tRNA synthetase. *Nat Struct Biol*. 2000 Jun;7(6):461-5.
38. Minajigi A, Francklyn CS. Aminoacyl transfer rate dictates choice of editing pathway in threonyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem*. 2010 Jul 30;285(31):23810-7.
39. Hussain T, Kruparani SP, Pal B, Dock-Bregeon AC, Dwivedi S, Shekar MR, Sureshbabu K, Sankaranarayanan R. Post-transfer editing mechanism of a D-aminoacyl-tRNA deacylase-like domain in threonyl-tRNA synthetase from archaea. *EMBO J*. 2006 Sep 6;25(17):4152-62.

40. Beebe K, Ribas De Pouplana L, Schimmel P. Elucidation of tRNA-dependent editing by a class II tRNA synthetase and significance for cell viability. *EMBO J.* 2003 Feb 3;22(3):668-75.
41. Dock-Bregeon AC, Rees B, Torres-Larios A, Bey G, Caillet J, Moras D. Achieving error-free translation; the mechanism of proofreading of threonyl-tRNA synthetase at atomic resolution. *Mol Cell.* 2004 Nov 5;16(3):375-86.
42. Aboelnga M., Hayward J., and Gault James. Enzymatic Post-Transfer Editing Mechanism of *E. coli* Threonyl-tRNA Synthetase (ThrRS): A Molecular Dynamics (MD) and Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) Investigation *ACS Catal.*, 2017, 7 (8), pp 5180–5193.
43. Ling J, Peterson KM, Simonovic I, Söll D, Simonovic M. The mechanism of pre-transfer editing in yeast mitochondrial threonyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem.* 2012 Aug 17;287(34):28518-25.
44. Ruff M, Krishnaswamy S, Boeglin M, Poterszman A, Mitschler A, Podjarny A, Rees B, Thierry JC, Moras D. Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Asp). *Science.* 1991 Jun 21;252(5013):1682-9.
45. Cusack S, Yaremchuk A, Tukalo M. The 2 Å crystal structure of leucyl-tRNA synthetase and its complex with a leucyl-adenylate analogue. *EMBO J.* 2000 May 15;19(10):2351-61.
46. Cvetesic N, Palencia A, Halasz I, Cusack S, Gruic-Sovulj I. The physiological target for LeuRS translational quality control is norvaline. *EMBO J.* 2014 Aug 1;33(15):1639-53.
47. Mursinna RS, Lincecum TL Jr, Martinis SA. A conserved threonine within *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase prevents hydrolytic editing of leucyl-tRNA<sup>Leu</sup>. *Biochemistry.* 2001 May 8;40(18):5376-81.
48. Wong FC, Beuning PJ, Silvers C, Musier-Forsyth K. An isolated class II aminoacyl-tRNA synthetase insertion domain is functional in amino acid editing. *J Biol Chem.* 2003 Dec 26;278(52):52857-64.

49. Beuning PJ, Musier-Forsyth K. Species-specific differences in amino acid editing by class II prolyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem.* 2001 Aug 17;276(33):30779-85.
50. Crepin T, Yaremchuk A, Tukalo M, Cusack S. Structures of two bacterial prolyl-tRNA synthetases with and without a cis-editing domain. *Structure.* 2006 Oct;14(10):1511-25.
51. Mortier J, Rakers C, Bermudez M, Murgueitio MS, Riniker S, Wolber G. The impact of molecular dynamics on drug design: applications for the characterization of ligand-macromolecule complexes. *Drug Discov Today.* 2015 Jun;20(6):686-702.
52. Zhang JL, Zheng QC, Chu WT, Zhang HX. Drug design benefits from molecular dynamics: some examples. *Curr Comput Aided Drug Des.* 2013 Dec;9(4):532-46.
53. Nguyen TT, Viet MH, Li MS. Effects of water models on binding affinity: evidence from all-atom simulation of binding of tamiflu to A/H5N1 neuraminidase. *ScientificWorldJournal.* 2014 Feb 2;2014:536084.
54. Dupradeau FY, Pigache A, Zaffran T, Savineau C, Lelong R, Grivel N, Lelong D, Rosanski W, Cieplak P. The R.E.D. tools: advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building. *Phys Chem Chem Phys.* 2010 Jul 28;12(28):7821-39.
55. Christopher I. Bayly, Piotr Cieplak, Wendy Cornell, and Peter A. Kollman. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.*, 1993, 97 (40), pp 10269–10280.
56. Virtual laboratory moldyngrid as a part of scientific infrastructure for biomolecular simulations / [A. O. Salnikov, I. A. Sliusar, O. O. Sudakov et al.]. // *Int J Computing.* – 2010. – Vol. 9. – P. 294–300.
57. Інтегроване середовище віртуальної лабораторії MolDynGrid для розрахунків молекулярної динаміки біополімерів / [А. О. Сальников, О. О.

Судаков, О. В. Савицький та ін.] // Медична інформатика та інженерія. – 2010. – Т. 3, – № 1. – С. 24–32

58. Boratyn GM, Schäffer AA, Agarwala R, Altschul SF, Lipman DJ, Madden TL. Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biol Direct.* 2012 Apr 17;7:12.

59. Lu XJ, Olson WK. 3DNA: a versatile, integrated software system for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic-acid structures. *Nat Protoc.* 2008;3(7):1213-27.

60. D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A.W. Goetz, I. Kolossvai, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R.M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.-J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. Mathews, M.G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, and P.A. Kollman (2012), AMBER 12, University of California, San Francisco

61. Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J Chem Theory Comput.* 2008 Mar;4(3):435-47.

62. Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comp Phys Commun.* 1995;91:43–56.

63. Dominguez C, Boelens R, Bonvin AM. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc.* 2003 Feb 19;125(7):1731-7.

64. Ngan CH, Bohnuud T, Mottarella SE, Beglov D, Villar EA, Hall DR, Kozakov D, Vajda S. FTMAP: extended protein mapping with user-selected probe molecules. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jul;40(Web Server issue):W271-5.

65. Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Taylor RD. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins.* 2003 Sep 1;52(4):609-23.



66. Martinis SA, Fox GE. Non-standard amino acid recognition by *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1997;36:125-8.
67. Boniecki MT, Vu MT, Betha AK, Martinis SA. CP1-dependent partitioning of pretransfer and posttransfer editing in leucyl-tRNA synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 9;105(49):19223-8.
68. Zhai Y, Martinis SA. Two conserved threonines collaborate in the *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase amino acid editing mechanism. *Biochemistry.* 2005 Nov 29;44(47):15437-43.
69. Rayevsky AV, Tukalo M A. 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. doi:10.7124/bc.00090E.
70. Nevena Cvetesic, Morana Dulic, Mirna Bilus, Nikolina Sostaric, Boris Lenhard, and Ita Gruic-Sovulj. Naturally Occurring Isoleucyl-tRNA Synthetase without tRNA-dependent Pre-transfer Editing. *J Biol Chem.* 2016 Apr 15; 291(16): 8618–8631
71. 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 Sep;84:74-81.
72. 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;76:289-95.
73. 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 Feb;35(3):669-682.

74. Ricci CG, de Andrade AS, Mottin M, Netz PA. Molecular dynamics of DNA: comparison of force fields and terminal nucleotide definitions. *J Phys Chem B*. 2010 Aug 5;114(30):9882-93.
75. Hagiwara Y, Field MJ, Nureki O, Tateno M. Editing mechanism of aminoacyl-tRNA synthetases operates by a hybrid ribozyme/protein catalyst. *J Am Chem Soc*. 2010 Mar 3;132(8):2751-8.
76. Gabor. Naray-Szabo, and Ferenczy GG. Molecular Electrostatics. *Chem. Rev.*, 1995, 95 (4), pp 829–847
77. Jensen F. *Introduction to Computational Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons; 1999.
78. Vanquelf E, Simon S, Marquant G, Garcia E, Klimerak G, Delepine JC, Cieplak P, Dupradeau FY. R.E.D. Server: a web service for deriving RESP and ESP charges and building force field libraries for new molecules and molecular fragments. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jul;39(Web Server issue):W511-7.
79. J Wang, P Cieplak, PA Kollman. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *Journal of computational chemistry*, 2000. 21 (12);1049-1074.
80. Rayevsky A.V., Tukalo M.A. Computational approaches for parameterization of aminoacyl-tRNA synthetase substrates. *Biopolymers and Cell*, 2018. 34(3):239–247. doi:10.7124/bc.00097E.
81. Richard S. Mursinna Tommie L. Lincecum Susan A. Martinis. A Conserved Threonine within Escherichia coli Leucyl-tRNA Synthetase Prevents Hydrolytic Editing of Leucyl-tRNA<sup>Leu</sup>. *Biochemistry*, 2001, 40, 18, 5376-5381.
82. Dulic M, Cvetesic N, Zivkovic I, Palencia A, Cusack S, Bertosa B, Gruic-Sovulj I. Kinetic Origin of Substrate Specificity in Post-Transfer Editing by Leucyl-tRNA Synthetase. *J Mol Biol*. 2018 Jan 5;430(1):1-16. doi: 10.1016/j.jmb.2017.10.024. Epub 2017 Oct 27

83. Kumar S, Das M, Hadad CM, Musier-Forsyth K. Substrate and enzyme functional groups contribute to translational quality control by bacterial prolyl-tRNA synthetase. *J Phys Chem B*. 2012 Jun 14;116(23):6991-9.
84. Kumar S, Das M, Hadad CM, Musier-Forsyth K. Substrate specificity of bacterial prolyl-tRNA synthetase editing domain is controlled by a tunable hydrophobic pocket. *J Biol Chem*. 2012 Jan 27;287(5):3175-84.
85. Englisch S, Englisch U, von der Haar F, Cramer F. The proofreading of hydroxy analogues of leucine and isoleucine by leucyl-tRNA synthetases from *E. coli* and yeast. *Nucleic Acids Res*. 1986 Oct 10;14(19):7529-39.
86. Perona JJ, Gruic-Sovulj I. Synthetic and editing mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetases. *Top Curr Chem*. 2014;344:1-41.
87. Cvetesic N, Perona JJ, Gruic-Sovulj I. Kinetic partitioning between synthetic and editing pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases occurs at both pre-transfer and post-transfer hydrolytic steps. *J Biol Chem*. 2012 Jul 20;287(30):25381-94.
88. Lincecum TL Jr, Tukalo M, Yaremchuk A, Mursinna RS, Williams AM, Sproat BS, Van Den Eynde W, Link A, Van Calenbergh S, Grøtli M, Martinis SA, Cusack S. Structural and mechanistic basis of pre- and posttransfer editing by leucyl-tRNA synthetase. *Mol Cell*. 2003 Apr;11(4):951-63.
89. Rock FL, Mao W, Yaremchuk A, Tukalo M, Crépin T, Zhou H, Zhang YK, Hernandez V, Akama T, Baker SJ, Plattner JJ, Shapiro L, Martinis SA, Benkovic SJ, Cusack S, Alley MR. An antifungal agent inhibits an aminoacyl-tRNA synthetase by trapping tRNA in the editing site. *Science*. 2007 Jun 22;316(5832):1759-61.
90. Jain V, Yogavel M, Oshima Y, Kikuchi H, Touquet B, Hakimi MA, Sharma A. Structure of Prolyl-tRNA Synthetase-Halofuginone Complex Provides Basis for Development of Drugs against Malaria and Toxoplasmosis. *Structure*. 2015 May 5;23(5):819-829.

91. Gudzera OI, Golub AG, Bdzhola VG, Volynets GP, Lukashov SS, Kovalenko OP, Krikliivi IA, Yaremchuk AD, Starosyla SA, Yarmoluk SM, Tukalo MA. Discovery of potent anti-tuberculosis agents targeting leucyl-tRNA synthetase. *Bioorg Med Chem*. 2016 Mar 1;24(5):1023-31.
92. Saint-Léger A, Sinadinos C, Ribas de Pouplana L. The growing pipeline of natural aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors for malaria treatment. *Bioengineered*. 2016 Apr 2;7(2):60-4.
93. Baumann T, Nickling JH, Bartholomae M, Buivydas A, Kuipers OP, Budisa N. Prospects of In vivo Incorporation of Non-canonical Amino Acids for the Chemical Diversification of Antimicrobial Peptides. *Front Microbiol*. 2017 Feb 2;8:124.
94. Dulic M, Cveticic N, Zivkovic I, Palencia A, Cusack S, Bertosa B, Gruic-Sovulj I. Kinetic Origin of Substrate Specificity in Post-Transfer Editing by Leucyl-tRNA Synthetase. *J Mol Biol*. 2018 Jan 5;430(1):1-16.
95. Tamura K. Molecular basis for chiral selection in RNA aminoacylation. *Int J Mol Sci*. 2011;12(7):4745-57.
96. Chen X, Ma JJ, Tan M, Yao P, Hu QH, Eriani G, Wang ED. Modular pathways for editing non-cognate amino acids by human cytoplasmic leucyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jan;39(1):235-47.
97. Fukunaga R, Yokoyama S. The C-terminal domain of the archaeal leucyl-tRNA synthetase prevents misediting of isoleucyl-tRNA(Ile). *Biochemistry*. 2007 May 1;46(17):4985-96.
98. The UniProt Consortium (2017) UniProt: the universal protein knowledgebase *Nucleic Acids Res*. 45, D158-D169.
99. Ji QQ, Fang ZP, Ye Q, Chi CW, Wang ED. Self-protective responses to norvaline-induced stress in a leucyl-tRNA synthetase editing-deficient yeast strain. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jul 7;45(12):7367-7381.

100. Mursinna RS, Lee KW, Briggs JM, Martinis MA. Molecular Dissection of a Critical Specificity Determinant within the Amino Acid Editing Domain of Leucyl-tRNA. Synthetase. *Biochemistry*. 2004;43:155-65

## Додаток А

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, **Raevskiy AV**, Ilchenko MM, Dubey IY, Krikliviy 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*)
6. **Raevskiy A**, Tukalo M. Molecular dynamics simulation study of *Thermus thermophilus* leucyl-tRNA synthetase with its 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, Krikliviy I, Cusack S. The methods of structural and computational biology in study of fidelity of gene 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 X 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**, Krikliviy 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**, Krikliviy 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, **Раевский АВ**, Крикливый ИА, Коваленко ОП, Ильченко НН, Дубей ИЯ, Яремчук АД, Тукало МА. тРНК обеспечивает точность синтеза пролил-тРНК<sup>Pro</sup> на двух этапах редактирования продукта. XI Український біохімічний конгрес, 2014, 6-10 жовтня, Київ, Україна. P. 16.
13. Бояршин КС, Присс АЕ, **Раевский АВ**, Крикливый ИА, 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, Krikliiviy 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.

**Додаток Б**  
**Акти впровадження**

**Київський національний університет імені Тараса Шевченка**  
**ННЦ «Інститут біології»**

Кафедра загальної та  
молекулярної генетики  
спеціалізація клітинна біологія  
та генетична інженерія

*Укладачі:* ст. наук. співр. Карпов П.А., асп. Самофалова Д.О., асп. Раєвський  
О.В., мол. наук. співр. Демчук О.М.

**СТРУКТУРНА БІОІНФОРМАТИКА**

**РОБОЧА НАВЧАЛЬНА ПРОГРАМА**

Для студентів спеціальності 7.070407 – “генетика”

**Затверджено**  
На засіданні кафедри  
Протокол № 12  
Від “29” червня 2011 р.  
Зав. кафедри

\_\_\_\_\_ Демидов С.В.

Директор ННЦ «Інститут біології»



Робоча навчальна програма з дисципліни “Структурна біоінформатика”

Укладачі: к.б.н., ст. наук. співр. Карпов Павло Андрійович, асп. Самофалова

Дарія Олексіївна, асп. Раєвський Олексій Володимирович, мол. наук. співр.

Демчук Олег Миколайович.



Лектор: к.б.н., ст. наук. співр. Карпов П. А.



Погоджено  
З науково-методичною  
комісією  
«30» червня 2011 р.

