

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

Кваліфікаційна наукова праця на
правах рукопису

РИБАК МАРІЯ ЮРІЇВНА



УДК 577.217.32: 577.217.39

**РОЛЬ АМІНОАЦИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗ та D-АМІНОАЦИЛ-ТРНК
ДЕАЦИЛАЗИ У ЗАБЕЗПЕЧЕННІ СТЕРЕОСПЕЦИФІЧНОЇ СЕЛЕКЦІЇ
АМІНОКИСЛОТ У ПРОЦЕСІ ТРАНСЛЯЦІЇ**

03.00.03 – молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

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

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

доктор біологічних наук, професор,
Верьовка Сергій Вікторович,
ДУ «Інститут отоларингології ім. проф.
О. С. Коломійченка НАМН України»,
завідувач лабораторією біохімії

Захист дисертації відбудеться 24 березня 2020 року о 10³⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Заболотного, 150.

Автореферат розіслано « » лютого 2020 року.

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



І. В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Аміноацил-тРНК синтетази (АРСази) є високоспецифічними ферментами апарату трансляції, що активують амінокислоти та приєднують їх до споріднених тРНК (Ibba and Söll, 2000). Однак специфічність АРСаз не абсолютна, а тому деякі представники АРСаз можуть помилково активувати схожі за розміром та бічним радикалом амінокислоти, створюючи проблему точності у процесі трансляції генетичної інформації. Якщо АРСаз має додатковий домен для корекції власних помилок, то він виступає в якості *цис*-редагувального фактора, що контролює якість трансляції, гідролізуючи помилкові субстрати у цьому домені. Однак не всі синтетази з певним браком специфічності мають власний апарат для корекції помилок. А тому для уникнення проблеми помилкового аміноацилювання для таких синтетаз існують додаткові білки, *транс*-редагувальні фактори, що гідролізують помилково утворені субстрати. Окрім проблеми з помилковою активацією амінокислот зі схожими бічними радикалами, існує також потреба в якісному розпізнаванні оптичного ізомеру амінокислоти. Відомо, що тирозил-тРНК-синтетаза виявляє найслабшу стереоспецифічність серед всіх АРСаз (Calendar and Berg, 1966). Через відсутність редагувального домену у її складі гідроліз D-аміноацил-тРНК здійснює D-аміноацил-тРНК-деацилаза, що має широку субстратну специфічність (Calendar and Berg, 1967; Bhatt et al., 2016; Calendar, 2017).

Вивчення механізмів контролю якості біосинтезу білка за участі АРСаз викликає інтерес дослідників вже не перше десятиліття (Sankaranarayanan and Moras, 2001; Ling et al., 2009; Yadavalli and Ibba, 2012), однак механізми, за якими еволюційно закріпилася гомохіральність відбору L-амінокислот у процесі трансляції, залишаються недостатньо вивченими. У літературних джерелах бракує даних щодо активації D-енантіомерів амінокислот всіма 20 АРСазами; відомо лише, що лейцил-, ізолейцил-, валіл-, метіоніл-тРНК синтетази (Bergmann et al., 1961), а також аспартил-тРНК синтетаза (Norton et al., 1963) активують <1% D-стереоізомерів гомологічних амінокислот. Нові дані щодо активації чи аміноацилювання D-амінокислот іншими АРСазами відсутні, а тому наше дослідження, що стосується визначення механізму стереоспецифічної селекції амінокислот за участі представників АРСаз першого (тирозил-тРНК синтетази) та другого класу (аланіл-тРНК синтетази) та додаткового редагувального фермента – D-аміноацил-тРНК деацилази *Thermus thermophilus*, вкрай актуальне.

Дослідження механізмів редагування D-амінокислот за участі АРСаз дасть змогу краще зрозуміти процеси, що забезпечують точність реалізації генетичної інформації у про- та еукаріотичних системах, а також створить підґрунтя синтетичній біології для синтезу D-амінокислотних пептидів, загальновідомих своїм використанням у фарміндустрії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація відповідає дослідницькій тематиці проєктів відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології та генетики НАНУ і виконувалась у рамках тем наукових досліджень 2.2.4.14 «Вивчення молекулярних основ точності трансляції генетичного коду в процесі утворення аміноацил-тРНК» (2010-2014), номер

державної реєстрації 0109007245; 2.2.4.14 «Адаптивна трансляція і механізми корекції помилок аміноацил-тРНК синтетазами *in vitro* та *in vivo*» (2015-2019), номер державної реєстрації 0114U006257; «Молекулярні механізми реалізації генетичної інформації» (2013-2014), номер державної реєстрації 0113U006147.

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи є з'ясування ролі тирозил- та аланіл-тРНК-синтетаз, а також D-аміноацил-тРНК-деацилази у забезпеченні стереоспецифічного відбору амінокислот на дорибосомному етапі біосинтезу білка.

Відповідно до мети поставлено такі завдання:

1. Розробити методику очищення аланіл-тРНК синтетази *T. thermophilus* (АлаРС) та з'ясувати її олігомерну організацію.

2. Клонувати ген D-аміноацил-тРНК^{Тир}-деацилази *T. thermophilus* (ДТД), розробити методику експресії цього гена в клітинах *E. coli* та процедуру очищення рекомбінантного білка.

3. Одержати *in vitro* транскрипти тРНК^{Тир}, отримати тРНК дикого типу та дезокси-форми, модифіковані по 2'- або 3'-положеннях рибози кінцевого аденозину (2'dA76 тРНК^{Тир} та 3'dA76 тРНК^{Тир}) для вивчення процесу аміноацилювання за участі тирозил-тРНК синтетази *T. thermophilus* (ТирРС).

4. Дослідити каталітичні властивості АлаРС у реакціях активації споріднених та неспоріднених амінокислот та формування аміноацил-тРНК.

5. Встановити роль 2'- і 3'-ОН груп кінцевого аденозину тРНК^{Тир} при аміноацилюванні L- та D-Тир за участі ТирРС.

6. Провести пошук амінокислотних залишків активного центру ДТД методами біоінформатичного аналізу (Ала-сканування) та методом сайт-спрямованого мутагенезу створити мутантні форми ДТД для з'ясування залишків, що впливають на функцію гідролізу.

7. Встановити роль тРНК^{Тир} у процесі гідролізу ДТД помилково аміноацильованих D-Тир-тРНК^{Тир} субстратів.

8. Порівняти отримані експериментальні дані з комп'ютерною моделлю механізму гідролізу D-Тир-тРНК^{Тир} за участі ДТД, отриманою методом молекулярної динаміки та квантово-хімічних розрахунків.

9. З'ясувати можливість посттрансферного редагування помилково аміноацильованих гліцил/D-аланіл-тРНК^{Ала} субстратів за участі АлаРС та ДТД.

Об'єкт дослідження – контроль стереоспецифічної селекції амінокислот за участі аланіл- та тирозил-тРНК синтетаз, а також D-аміноацил-тРНК деацилази з *T. thermophilus*.

Предмет дослідження – функціональна здатність ТирРС та АлаРС до утворення, а ДТД – до гідролізу помилково утворених субстратів тРНК з D-амінокислотами.

Методи дослідження – полімеразна ланцюгова реакція, сайт-спрямований мутагенез, ферментативна модифікація тРНК^{Тир}, [³²P]-мічення тРНК^{Тир} та тРНК^{Ала}, методи ферментативної та неферментативної кінетики з [³²P]/[¹⁴C]-радіоактивними мітками, електрофорез білків та нуклеїнових кислот, хроматографічні методи (афінна, іонообмінна, гель-фільтраційна, тонкошарова хроматографія), Вестерн-блот

аналіз, біоінформатичний аналіз, порівняльний аналіз біохімічних даних із даними комп'ютерного моделювання та квантової хімії.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше встановлено субстрат-асистований механізм гідролізу D-Тир-тРНК^{Тир} за участі ДТД, в якому ключову роль відіграє вільна 2'-гідроксильна група А76 тРНК^{Тир} та беруть участь дві молекули води. Отримані експериментальні дані (сайт-спрямованого мутагенезу активного центру ДТД, ферментативної кінетики із різними тРНК^{Тир} субстратами) повністю узгоджуються з даними комп'ютерного моделювання (молекулярної динаміки та квантово-хімічних розрахунків) щодо запропонованого механізму гідролізу D-Тир-тРНК^{Тир}. Встановлено подвійну роль 2'-ОН групи А76 тРНК^{Тир} в аміноацилюванні D-Тир та гідролізі D-аміноацил-тРНК. Уперше показано здатність АлаРС аміноацилювати тРНК^{Ала} D-Ала та D-Сер. Встановлено рівні активації споріднених (L-Ала) та неспоріднених (Глі, L-Сер, D-Сер, D-Ала) амінокислот мутантною формою АлаРС (С666А) *E. coli* та АлаРС *T. thermophilus*. Уперше продемонстровано тРНК-залежне посттрансферне редагування D-аміноацил-тРНК за участі АРСаз та встановлено, що редагувальний домен АлаРС відповідальний за контроль стереоспецифічності через гідроліз D-Ала-тРНК^{Ала}. Дослідження механізмів редагування за участі АлаРС та ДТД дозволило нам сформулювати еволюційну гіпотезу щодо двох ймовірних сценаріїв стереоселективного відбору амінокислот в апараті трансляції – за участі ДТД та без неї.

Практичне значення одержаних результатів. Оптимізована методика експресії та очищення ДТД та АлаРС, розроблені методи аналізу активності цих ферментів можуть слугувати для подальших досліджень апарату трансляції. Дані щодо механізму гідролізу D-аміноацил-тРНК можуть екстраполюватися на інші системи, у яких відбувається гідроліз ефірних зв'язків у біологічних системах, а також можуть слугувати підґрунтям для створення ортогональних пар АлаРС та тРНК^{Ала} для редизайну стереоспецифічності фермента шляхом включення D-Ала та отримання D-Ала-вмісних пептидів для фармакологічних цілей.

Особистий внесок здобувача. Автор самостійно підібрав та провів аналіз наукової літератури за темою дисертації, одноосібно виконав експериментальні дослідження, здійснив інтерпретацію результатів та статистичну обробку даних. Головна ідея та завдання дослідження були сформульовані спільно з науковим керівником – д.б.н. Тукалом М. А. Здобувачем було клоновано ген ДТД, розроблено методику експресії та очищення білка, отримано препарати тРНК^{Тир} дикого типу та її похідних 2'- і 3'-дезоксиди А76 тРНК^{Тир}, отримано [³²P]-препарати тРНК^{Тир} та тРНК^{Ала}, розроблено методи аналізу активності ДТД та АлаРС, поставлено всі ферментативні та неферментативні реакції, проведено аналіз отриманих даних. Спільно з к.б.н. Коваленко О. П. було сплановано роботу щодо переклонування та аналізу експресії ДТД, очищення тРНК^{Тир}, радіоактивного мічення тРНК за допомогою [³²P]-АТФ та аналізу їхньої активності. Разом із к.б.н. Гудzeroю О. Й. отримано препарати АлаРС та тРНК^{Ала}. Очистка тРНК^{Тир}/тРНК^{Ала}/АлаРС/ДТД на системі HPLC проводилася разом із Крикливим І. А. Автор дякує к.б.н. Коваленко О. П. та к.б.н. Яремчук Г. Д. за люб'язно надані конструкції ДТД та тРНК^{Тир} відповідно, а також к.б.н. Гудzeroю О. Й. за очищений препарат ТирРС. Автор висловлює вдячність к.б.н. Коваленко О. П. за слушні рекомендації щодо

постановки методів ферментативної кінетики та обговорення результатів отриманих досліджень. Автор дякує також Пріс А. Є. за клонування гену АлаРС та Ковальчук А. О. за очистку препаратів АлаРС та тРНК^{Ала}. Автор щиро вдячний к.б.н. Раєвському О. В. за проведені симуляції молекулярної динаміки ДТД та АлаРС. Автор також висловлює подяку к.х.н. Ільченку М. М. за підготовку та проведення квантово-механічних розрахунків, а також д.х.н. Дубею І. Я. за інтерпретацію даних, пов'язаних із механізмом гідролізу. Автор виловлює слова щирої вдячності безпосередньому керівнику роботи, д.б.н, академіку НАНУ Тукалу М. А. за слушні поради, рекомендації та зауваження під час виконання дисертаційної роботи. Отримані результати обговорено та опубліковано у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дослідження та окремі положення дисертації були апробовані на засіданнях відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ. Результати досліджень було представлено та обговорено на таких з'їздах та конференціях: XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014), IX annual Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU dedicated to 160th Anniversary of M. F. Kastschenko (Kyiv, 2015), International Conference of the Young Scientists (CYS-2015) (Kyiv, 2015), X Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NASU (Kyiv, 2016), X Parnas Conference Young Scientist Forum “Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine” (Wroclaw, Poland, 2016), IX International meeting “From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies” (Lviv, 2016), 2nd Conference for young scientists of the division of Biochemistry, physiology and Molecular Biology NASU (Kyiv, 2017), 42nd FEBS Congress “From molecules to cells and back” (Jerusalem, Israel, 2017), Conference of Young Scientists “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” (Kyiv, 2018), XI Parnas Conference – Young scientists forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine” (Kyiv, 2018), EMBO Workshop “Enzyme, biocatalysis and chemical biology: The new frontiers” (Pavia, Italy, 2018), 27th tRNA Conference (Strasbourg, France, 2018), XIII International Young Scientists' Conference “Biology: from a molecule up to the biosphere” (Kharkiv, 2018), FEBS Practical Course: Biomolecules in Action II (Hamburg, Germany, 23-28 June 2019), XII Українському біохімічному конгресі, присвяченому 165^й річниці від дня народження І. Я. Горбачевського (Тернопіль, 2019), 12th International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetases (Hangzhou, China, 5-9 November 2019).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 22 наукові праці, з них 5 статей у фахових журналах, які входять до наукометричної бази даних Scopus (3 з яких належать також до першого квартилю (Q1) бази даних Web of Science Core Collection відповідно до класифікації Journal Citation Reports – *Journal of Molecular Biology, Biochemical Journal, Nucleic Acids Research*) та 17 тез доповідей у збірниках матеріалів закордонних та вітчизняних наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається з анотації, переліку публікацій, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 203 найменування. Дисертацію викладено на 169 сторінках, вона містить 49 рисунків та 9 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У першому розділі (огляд літератури) розглянуто сучасний стан проблеми стереоспецифічності в апараті трансляції, описано особливості структурної та функціональної організації аміноацил-тРНК-синтетаз I та II класів та точок контролю стереоселективності під час біосинтезу білка. Аналізуючи літературу, виявлено відсутність експериментальних даних щодо механізму гідролізу помилкових субстратів D-аміноацил-тРНК за участі ДТД, а також щодо можливості активації D-амінокислот за участі АРСаз II класу та ймовірної участі їх редагувальних доменів у редагуванні помилково ацильованих тРНК за участі D-амінокислот.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У ході роботи було використано клітини *Escherichia coli* BL21(DE3)Star, BL21(DE3)pLysS і Top10 з культивуванням їх у твердому та рідкому середовищах Лурія-Бертані (LB), а також у ТВ (Terrific-Broth), калій-фосфатному та 2xTY. Синтез праймерів для сайт-спрямованого мутагенезу ДТД проводився в «Invitrogen».

Експресія рекомбінантних білків. Рекомбінантну Гіс-ДТД дикого типу та її 12 мутантних форм експресували в штамі *E. coli* BL21(DE3)pLysS в ТВ середовищі. Очищали білок за допомогою афінної хроматографії (Ni-NTA Sepharose Fast Flow, GE Healthcare), аніон-обмінної (Q-Sepharose Fast Flow, Pharmacia) та гел'фільтраційної (Hi-Load 16/60 Superdex S 200, Pharmacia Biotech). Відщеплення Гіс-мітки від ДТД проводили в реакції з TEV-протеазою, підтверджуючи його відсутність за допомогою Вестерн-блот аналізу з антитілами анти-Гіс (Sigma) та електрофоретичним аналізом за методом Леммлі. Рекомбінантну АлаРС(6xГіс) експресували в *E. coli* BL21(DE3)Star (в LB) та очищали на колонках Ni-NTA Sepharose та Hi-Load 16/60 Superdex S 200. Концентрації білків визначали методом Бредфорд (Bradford, 1976) та спектрофотометрично. Мутантні форми гена ДТД отримували методом QuickChange™ (Stratagene).

Отримання препаратів тРНК. Плазмідну ДНК (pUC18) з геном тРНК отримували за допомогою NucleoBond Xtra MidiPrep Kit (Macherey-Nagel), потім лінеаризували за допомогою рестриктази MvaI (BstNI). Отриману після рестрикції матрицю використовували для транскрипції *in vitro* за участі T7-полімерази. Результат транскрипції перевіряли електрофоретично у 8% ПААГ з 7М сечовиною. Очищення отриманої тРНК проводили на аніон-обмінній колонці DEAE-Toyopearl 650M (ToyoSoda) та методом ВЕРХ на колонці ProSwift™ Wax-1S (DIONEX). Реакцію відщеплення ССА-кінця тРНК^{Тир} здійснювали за допомогою фосфодіестерази I з отрути *Crotalus adamanteus* та проводили добудову ССА-кінця у реакції з нуклеотидилтрансферазою (НТазою) *Bacillus stearothermophilus*. Остаточний препарат тРНК дикого типу було отримано після очистки за допомогою ВЕРХ, а препарати модифікованих 2'/3'd A76 тРНК – шляхом елюції з гелю. Для підтвердження однорідності термінального аденозину (А) обробляли аліквоти мічених тРНК періодатом натрію (NaIO₄) згідно з протоколом (Nordin and Schimmel, 2002).

Отримання $[^{32}\text{P}]$ -мічених $\text{тРНК}^{\text{Тир}}$ та $\text{тРНК}^{\text{Ала}}$. Синтез $[^{32}\text{P}]$ -А76 $\text{тРНК}^{\text{Тир}}/\text{тРНК}^{\text{Ала}}$ виконували з допомогою 150нМ нуклеотидилтрансферази *V. stearothermophilus*, 10 мкМ ЦТФ та 0,8 мкМ $[^{32}\text{P}]$ -АТФ (3000 Сі/ммоль, Perkin Elmer) у реакції з 10 мкМ тРНК (без ССА-кінця); $[^{32}\text{P}]$ -2'd та $[^{32}\text{P}]$ -3'dA76 $\text{тРНК}^{\text{Тир}}$ синтезували за участі 10 мкМ NТази та 125 мкМ 2'd/3'dАТФ і 5 мкМ $[^{32}\text{P}]$ -2'dАТФ (6000 Сі/ммоль, Perkin Elmer) або $[^{32}\text{P}]$ -3'dАТФ (5000 Сі/ммоль, Perkin Elmer) протягом 30 хв при 60 °С.

Реакції аміноацилювання за участі *TyrPC T. thermophilus*. Реакції з $[^{32}\text{P}]$ -міченою $\text{тРНК}^{\text{Тир}}$ проводили при 60 °С в буфері для *TyrPC* (25 мМ HEPES-NaOH (рН 7.5), 5 мМ ДТТ, 10 мМ MgCl_2 , 2 мМ АТФ, 15 мМ KCl, 0.2 мг/мл БСА) з 0,25-200 мкМ L/D-Тир, 5 мкМ $\text{тРНК}^{\text{Тир}}$ та залишковими кількостями $[^{32}\text{P}]$ -міченої $\text{тРНК}^{\text{Тир}}$. Реакцію зупиняли додаванням 200 мМ NaOAc до аліквоти з подальшою обробкою за участі S1 або P1-нуклеаз згідно протоколу (Ledoux, 2008). Аліквоти наносили на поліетиленімін-целюлозні (PEI) пластини (Merck KGaA, Німеччина), попередньо промиті ddH₂O. Розділення продуктів реакції відбувалося за методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) у 0,1 М амоній ацетату та 5% льодяній оцтовій кислоті (Tan et al., 2010) з подальшим фосфорним аналізом з використанням програми PharosFXTM Plus та програмного забезпечення QuantaOne (BioRad). Концентрацію аміноацильованих тРНК вимірювали аналогічно до методики, описаної в (Pasman et al., 2011).

Реакції АТФ-пірофосфатного (ФФ_H) обміну за участі *АлаРС* та *ТирРС*. АТФ- ФФ_H обмін за участі *АлаРС* здійснювали при 60 °С в реакційному буфері *АлаРС* (75 мМ HEPES-NaOH (рН 7.5), 10 мМ MgCl_2 , 20 мМ KCl, 1 мМ ДТТ, 4 мМ АТФ) або *ТирРС* (25 мМ HEPES-NaOH (рН 7.5), 10 мМ MgCl_2 , 15 мМ KCl, 5 мМ ДТТ), доповненому 1 мМ $[^{32}\text{P}]$ - ФФ_H (5 мкСі/мл; Perkin Elmer). Концентрації L/D-аланіну, гліцину, L/D-серину (Sigma), L-тирозину (Pierce) та D-тирозину (Sigma) змінювались орієнтовно в межах 0.1–10 K_m (константа Міхаеліса-Ментен). Реакції запускали ферментом у різних концентраціях для кожного субстрату. Аліквоти відбирали в конкретні моменти часу, зупиняючи реакцію холодним 400 мМ NaOAc (рН 5.02), обробляли S1-нуклеазою (ThermoScientific) і проводили аналіз на тонкошаровій хроматографії (ТШХ або TLC) згідно з (Francklyn et al., 2008). Для визначення кінетичних параметрів (значень K_m і k_{cat}) з графіка Міхаеліса-Ментен за формулою $V_o = \frac{dP}{dt} = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_m + [S]}$ були використані значення мінімум трьох незалежних вимірювань та обчислені в програмі OriginPro 8.5 (Hyperb за формулою $y = \frac{P1 \times x}{P2 + x}$), де V_{max} (P1) – максимальна швидкість реакції при повному насиченні фермента субстратом, K_m (P2) – константа Міхаеліса-Ментен або та концентрація субстрату, при якій швидкість реакції дорівнює половині максимальної. Пластини ТШХ кількісно обраховували за методикою, описаною вище для реакцій аміноацилювання.

Реакції аміноацилювання, деацилювання та загальний аналіз редагування за участі *АлаРС*. Аміноацилювання за участі *АлаРС* проводили з використанням радіоактивноміченої $\text{тРНК}^{\text{Ала}}$ та споріднених/неспоріднених до *АлаРС* амінокислот при 37 °С у стандартному *АлаРС* буфері за тих самих умов, що було наведено вище для реакцій накопичення АМФ в реакції пірофосфатного обміну. Відсоток рівня

редагування визначали за концентрацією утвореного [^{32}P]-АМФ при 60 °С протягом 30 хв у стандартному реакційному буфері АлаРС, доповненому 1 мМ АТФ, 2 мМ L-Ала або 50–500 мМ D-Ала/Глі/L-Сер/D-Сер та слідовими кількостями [^{32}P]-АТФ (3000 Сі/ммоль, Perkin Elmer) та 0.1 мг/мл БСА у відсутності або у присутності 10 мкМ тРНК^{Ала} або тРНК^{Ала}_{ок} (окисненої NaIO₄) та 1 мкМ АлаРС. Реакції запускали додаванням ферменту, зупиняли в 400 мМ NaOAc з подальшою обробкою S1-нуклеазою та ТШХ-аналізом.

Аналіз гідролізу препаратів тирозил-тРНК^{Тир} за участі ДТД та гліцил/аланіл-тРНК^{Ала} за участі ДТД та АлаРС. Деацилювання субстратів L/D-Тир-[^{32}P]-тРНК^{Тир} проводили у стандартному реакційному буфері для ДТД (25 мМ HEPES-NaOH (рН 7.5), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ ДТТ, 0.1 мг/мл БСА), доповненому різними концентрації ДТД при 37 °С. Реакції деацилювання за участі АлаРС проводили з використанням 0.25 мкМ L/D-Ала/Глі-[^{32}P]-тРНК^{Ала} при 37 °С у стандартному реакційному буфері для АлаРС, доповненому 0.1 мг/мл БСА. Концентрації ферментів варіювали. Аліквоти реакційної суміші, зібрані в різні моменти часу, піддавали обробці S1- або P1-нуклеазою та аналізували за методикою, описаною вище для реакцій аміноацилювання.

Біоінформатичний аналіз та статистична обробка результатів. У роботі були використані інструменти для аналізу нуклеотидних та білкових послідовностей (Clustal Omega, MEGA, BLAST, ProtParam, Extinction Coefficient Calculator) та візуалізації динаміки білково-нуклеїнових комплексів (PyMol). Експериментальні дані з 3-4 незалежних повторів оброблялися статистично з обчисленням середнього значення (M), середнього квадратичного відхилення (δ або $\pm\text{SD}$) і середньої квадратичної похибки (m або $\pm\text{SE}$). Для визначення достовірності відмінностей між експериментами використовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA). Статистичну обробку результатів та побудову графіків проводили за допомогою програмного забезпечення OriginPro 8.5.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримання рекомбінантної АлаРС *T. thermophilus*. АлаРС було клоновано з додаванням Гіс-мітки в С-термінальну частину протеїну. Першим етапом очищення білка була афінна хроматографія на Ni-NTA-Sepharose, другим – гель-фільтрація на Superdex 200. Профіль елюції АлаРС(6xГіс) на колонці для гель-фільтрації представлений на рис. 1. а; разом із профілями елюції маркерних білків його використовували для визначення молекулярної маси фермента (MW) (рис. 1. б). Розрахункова молекулярна маса (~100 кДа) за ПААГ збігається з теоретично розрахованою (97.5 кДа) для мономерної форми. Експериментально розрахована MW_{АлаРС}=204.2 кДа свідчила про потенційну димерну форму АлаРС. Калібрувальна крива показана на рис. 1. б. Загальна кількість очищеного білка становила ~1,5 мг з 1 л бактеріальної культури. Таким чином, рекомбінантний білок АлаРС(6xГіс) успішно експресували в *E. coli* і очистили до однорідності без домішок деградованих форм. АлаРС(6xГіс) була використана для подальших досліджень ферментативної кінетики для з'ясування механізмів активації та редагування неспоріднених амінокислот.

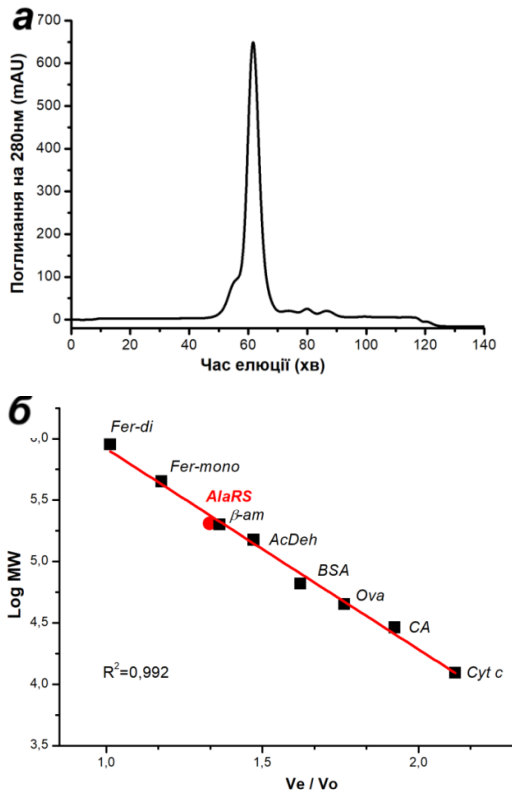


Рис. 1. Очищення АлаРС методом гель-фільтрації на колонці Superdex S 200 та визначення молекулярної маси білка. (а) Профіль елюції для АлаРС(6хГіс) зі швидкістю потоку 1 мл / хв. (б) Калібрувальна крива, отримана за результатами елюції маркерних білків на Superdex S 200 (Fer-di – димер феритину; Fer-моно – мономер феритину; β -А – β -амілаза; Cat – каталаза; AcDeh – алкогольдегідрогеназа; BSA – альбумін бичачої сироватки; Ova – яєчний альбумін; AlaRS – аланіл-тРНК синтетаза; CA – карбоангідраза; Cyt.c – цитохром с)

Клонування, експресія та очищення ДТД *T. thermophilus* (ДТД). Ген ДТД було клоновано за допомогою вектора pProEXHTb (4778 п.о.) (прокаріотична система для експресії ProEXTM HT), що має Trc- промотор, вбудовану 6хГіс послідовність на N-кінці протеїну та сайт для TEV-протеази для подальшого відщеплення 6хГіс. Рівень експресії ДТД в клітинах *E. coli*

BL21(DE3)pLysS перевіряли за різних концентрацій IPTG та в декількох середовищах (LB, ТВ, Р, 2хГУ). Найкращими отриманими умовами були наступні: 4-5 год індукції 0,6 mM IPTG при 37 °C у ТВ середовищі (рис. 2). Першим етапом очищення (6хГіс)ДТД була афінна хроматографія на Ni-NTA, результат якої представлений на рис. 2. а. Фермент, елюований із колонки 400 mM імідазолом, містив домішки білків з більшою молекулярною масою. Для видалення полігістидинової послідовності з ферменту (6хГіс)ДТД було використано рекомбінантну TEV-протеазу. Ефективність відщеплення перевіряли за допомогою ПААГ в денатуруючих умовах та Вестерн-блот аналізу з анти-Гіс антитілами (рис. 2. б). Відсутність сигналу на доріжці 2 панелі Вестерн-блоту підтверджувала повне видалення полігістидинової послідовності з ДТД. Крім того, добре помітним був також зсув у міграції ДТД на ПААГ в денатуруючих умовах (доріжка 2, ліва панель) після обробки TEV-протеазою. Отже, відщеплення Гіс-мітки від Гіс-ДТД можна просто контролювати за допомогою ПААГ в денатуруючих умовах.

Для позбавлення від домішок білків із більш високою молекулярною масою в препараті ДТД було використано гель-фільтраційну хроматографію в якості заключного етапу очищення білка. Профіль елюції ДТД показано на рис. 3. а; з огляду на нього, ДТД було ефективно відокремлено від інших білків та елюовано з колонки єдиним піком (рис. 3. а). Відповідно до ПААГ в денатуруючих умовах (рис. 3. б), чистоту ДТД можна оцінити як понад 90%. Аналіз профілю елюції ДТД разом з маркерними протеїнами показав, що $MW_{\text{ДТД}}=32$ кДа (теоретично розрахована $MW_{\text{ДТД}}=16.7$ кДа). Отже, очищений рекомбінантний білок, швидше за все, є димером в розчині. Однак мономерна несферична (витягнута) форма цього білка також не може бути виключеною.

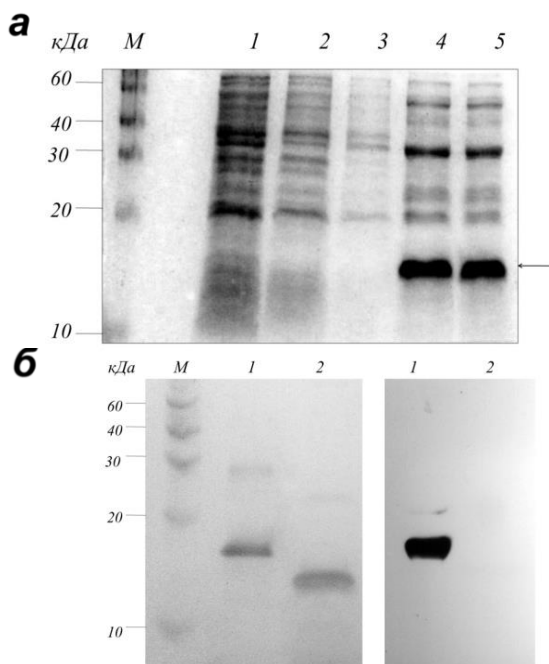


Рис. 2. Етапи очищення (6xHis)ДТД. (а) Очищення на колонці з Ni-NTA, 15% ПААГ в денатуруючих умовах: М – білковий маркер (Roti-Mark 10-150 «Roth», Німеччина); 1 – розчинний білковий лізат; 2 – фракція, що не зв'язалася з Ni-NTA; 3 – промивання колонки; 4 – об'єднані фракції елюції з ДТД; 5 – (6xHis)ДТД після діалізу. Положення (6xHis)ДТД на гелі позначено стрілкою. (б) 15% ПААГ в денатуруючих умовах (ліва панель) та Вестерн-блот аналіз (права панель) аналізу (6xHis)ДТД до (1) та після (2) обробки TEV-протеазою

Отже, в ході роботи рекомбінантну D-аміноацил-тРНК деацилазу з *T. thermophilus* клонували за допомогою вектора pProEXHTb та успішно експресували в штамі *E. coli* BL21(DE3)pLysS в ТВ середовищі. Розроблений метод очищення дозволяє отримати 2 мг ферменту з 1 л бактеріальної культури.

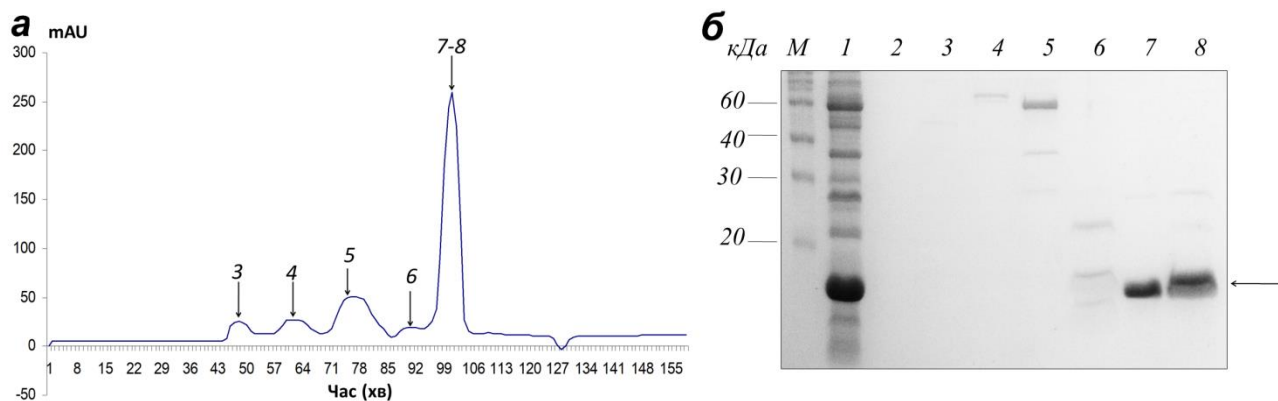


Рис. 3. Очищення ДТД методом гелі-фільтрації. (а) Профіль елюції ДТД на колонці Superdex S 200. (б) 15% ПААГ в денатуруючих умовах фракцій елюції на Superdex 200: М – білковий маркер (Roti-Mark 10-150, «Roth»); 1 – ДТД, нанесений на колонку Superdex 200; 2 – порожня доріжка; доріжки 3-8 – відповідні фракції, отримані після гелі-фільтрації. Положення ДТД позначено стрілкою

Каталітичні властивості АлаРС *T. thermophilus*. Активація споріднених та неспоріднених амінокислот АлаРС. Будучи віддаленими членами родини АРСаз, ТирРС та АлаРС можуть мати різну специфічність щодо D-амінокислот. Необхідність широкого діапазону *транс*- та *цис*-редагувальних факторів в системі АлаРС обумовлена високою частотою помилкової активації неспоріднених амінокислот (Глі, Сер). Досліджено здатність АлаРС активувати D-Ала та D-Сер та порівняли її з активацією інших амінокислот – L-Ала, L-Сер та Глі. Загальний ефект відповідав 193-кратній втраті каталітичної ефективності для Глі, 237-кратній – для L-Сер, 467 – для D-Ала та приблизно 180 650-кратній для D-Сер (табл. 1).

Кінетичні параметри АлаРС в реакції АТФ-ФФ_n обміну¹

Аміно-кислота	k_{cat} (с ⁻¹)	K_m (мМ)	k_{cat}/K_m (мМ ⁻¹ с ⁻¹)	Фактор дискримінації ²
L-Ала ³	7.88 ± 2.6	0.139 ± 0.012	56	1
D-Ала ⁴	0.21 ± 0.03	2.19 ± 0.50	0.12	467
Глі ⁵	6.5 ± 1.6	22 ± 8	0.29	193
L-Сер ⁶	2.3 ± 0.8	10 ± 2	0.236	237
D-Сер ⁷	0.127 ± 0.028	407 ± 59	0.00031	180 645

Примітки:

1. Дані представляють середні значення ± SE (n = 3), обчислені в реакції АТФ-ФФ_n обміну при 60 °С (рН 7.5). [L-Ала] були в діапазоні від 10 мкМ до 2 мМ, [D-Ала] – від 0.1 мМ до 25 мМ, [Глі] – від 5 мМ до 250 мМ, [L-Сер] – від 0.5 мМ до 100 мМ, [D-Сер] – від 50 мМ до 1 М.

2. Фактор дискримінації = $(k_{cat}/K_m)_{L-Ала}$ (споріднена амінокислота) / $(k_{cat}/K_m)_{неспоріднена}$

3-6. АлаРС використовували у концентрації ³15 нМ, ⁴1 мкМ, ⁵100 нМ, ⁶2.5 мкМ.

Крім того, перевірено гіпотезу щодо активації D-амінокислот іншими АлаРС з добре вивченою мутантною формою фермента АлаРС (С666А) *E. coli*, що є практично неспроможною до редагування помилково утворених субстратів з Глі та Сер. Аналогічні показники були отримані для АлаРС (С666А) *E. coli* (рис. 4. а): 107-кратна втрата ефективності для L-Сер, 207 для Глі, 333 для D-Ала і 67 400 для D-Сер. Порівняння наших даних із літературними засвідчують загальну тенденцію помилкової активації амінокислот для трьох систем (рис. 4. б).

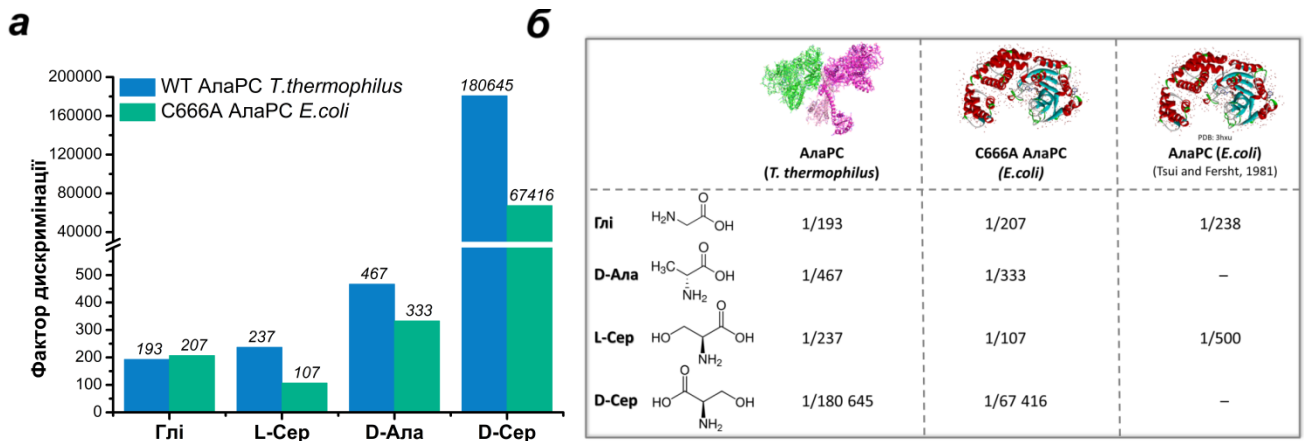


Рис. 4. (а) Показники каталітичної ефективності для неспоріднених амінокислот, що помилково активуються АлаРС *T.thermophilus* та АлаРС (С666А) *E. coli* (поточні дослідження, реакція пірофосфатного обміну) (б) порівняно з літературними даними (Tsui and Fersht, 1981)

АлаРС помилково аміноацилює тРНК^{Ала} за допомогою D-Ала та D-Сер. Аналізуючи літературні дані попередніх досліджень АлаРС, не знайдено вичерпної інформації щодо показників швидкості аміноацилювання з усіма неспорідненими субстратами. Тому проведено реакції аміноацилювання з L-Ала, Глі, L-Сер, D-Ала і D-Сер і перевірено потенційну можливість приєднання D-Ала і D-Сер до [³²P]-

тРНК^{Ала}. Цікаво, що з очищеною нативною тРНК^{Ала} спостерігалася подібну акцепторну активність тРНК^{Ала} (приблизно 30% аміноацил-тРНК) для трьох амінокислот: спорідненої L-Ала та неспоріднених Глі та D-Ала (рис. 5. б). На рис. 5.а показана ТШХ-пластина, що демонструє хід аміноацилювання [³²P]-тРНК^{Ала} в часі за участі 1 мкМ АлаРС з використанням 2 мМ L-Ала, 500 мМ Глі/D-Ала/L-Сер/D-Сер. Концентрації обох субстратів, як амінокислот, так і тРНК^{Ала} (10 мкМ тРНК^{Ала}), були насичувальними. Швидкість аміноацилювання для L-Сер знижувалася з 20% (5 хв) до 5% (30 хв) протягом реакції. Ці дані можуть свідчити про високий рівень деацилювання Сер-тРНК^{Ала}, що також є високим для синтетези *E. coli* (Beebe et al., 2003; Pasman et al., 2011). Аналогічний стаціонарний рівень Ала-тРНК спостерігався під час аміноацилювання АлаРС *E. coli* з тРНК (YFA2), що виявляє подвійну специфічність до Фен та Ала (Wolfson et al., 2002). Таким чином, наші результати відображають стан рівноваги між швидкістю аміноацилювання та деацилювання, що каталізується АлаРС *T. thermophilus*.

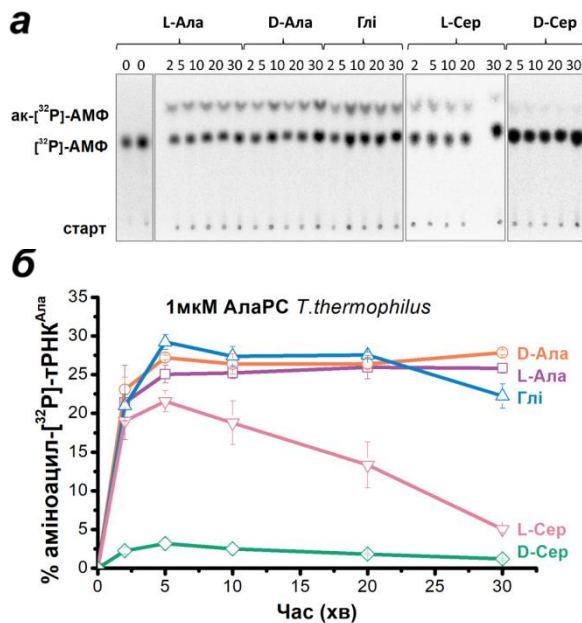


Рис. 5. Акцепторна активність нативної тРНК^{Ала} щодо L-аланіну, D-аланіну, гліцину, L-серину та D-серину за участі АлаРС (WT) (+37 °С, рН 7.5). (а) Аналіз аміноацилювання на основі ТШХ, що показує хроматографічне розділення аміноацил-[³²P]-АМФ та [³²P]-АМФ. (б) Графічне зображення даних ТШХ, показаних на рисунку а

Кінетичні параметри синтезу аміноацил-тРНК визначалися для L-Ала, D-Ала та Глі. На противагу значенням для етапу активації амінокислот, значення k_{cat} зменшилось у 9 разів для L-Ала, у 70 разів для D-Ала та в 140 разів для Глі (табл. 2). Показник K_m для D-Ала показав 12-кратне збільшення,

тоді як для L-Ала та Глі цей параметр суттєво не змінився. Отримані результати свідчать про високу афінність неспоріднених амінокислот (гліцину та D-аланіну) в реакції аміноацилювання з тРНК^{Ала}, а отже, високу потребу в гідролізі помилково ацильованих тРНК.

Таблиця 2

Кінетичні параметри аміноацилювання за участі АлаРС¹

Амінокислота	k_{cat} (с ⁻¹)	K_m (мМ)	k_{cat}/K_m (мМ ⁻¹ с ⁻¹)
L-Ала ²	0.86 ± 0.22	0.086 ± 0.020	10
D-Ала ³	0.003 ± 0.0002	27.35 ± 8.01	0.00011
Глі ⁴	0.045 ± 0.018	26.35 ± 7.99	0.00170

Примітки:

1. Дані представлені як середні значення ± SE (n = 3), отримані в реакції аміноацилювання з [³²P]-тРНК^{Ала} при 60 °С (рН 7.5).

2-4. АлаРС використовували у концентрації ²15 нМ, ³1 мкМ та ⁴100 нМ.

Отримані препарати тРНК продемонстрували високий рівень чистоти (понад 95%) та були використані в подальших дослідженнях ферментативної кінетики (рис. 7. в).

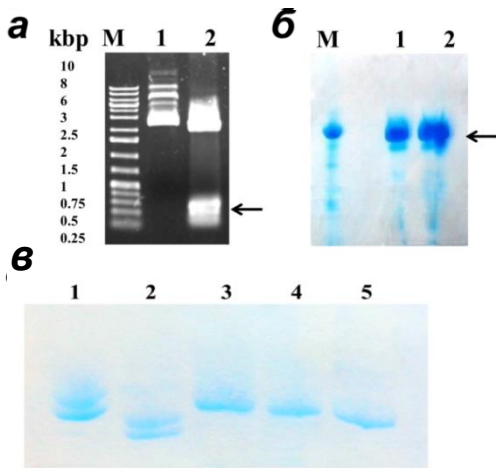


Рис. 7. Електрофореграми препаратів тРНК^{Tyr}. (а) Отримання ДНК-матриці з геном тРНК^{Tyr}, 1% агарозний гель: М – маркер (Gene Ruler, 1 kb), 1 – плазмідна ДНК рUC18-тРНК^{Tyr}, 2 – рUC18-тРНК^{Tyr} після рестрикції за допомогою MvaI. (б) Результат транскрипції *in vitro* (8% ПААГ+7М сечовина): М – тРНК^{Tyr} *E. coli* (5 мкг), 1 – 5 мкл транскрипту тРНК^{Tyr} *T. thermophilus*, 2 – 10 мкл транскрипту тРНК^{Tyr} *T. thermophilus* тРНК^{Tyr}. (в) Результат очистки модифікованих препаратів тРНК^{Tyr} (8% ПААГ+7М сечовина): 1 – транскрипт тРНК^{Tyr} (після транскрипції *in vitro*), 2 – тРНК^{Tyr} після відрізання ССА-кінця, 3 – А76 тРНК^{Tyr}, 4 – 2'dA76 тРНК^{Tyr}, 5 – 3'dA76 тРНК^{Tyr}

У ході дослідження було з'ясовано кінетичні параметри реакції аміноацилювання для ТирРС *T. thermophilus in vitro* (табл. 3) з тРНК^{Tyr} (тРНК дикого типу з двома гідроксильними групами рибози кінцевого аденозину). Коефіцієнт дискримінації (співвідношення між k_{cat}/K_m спорідненої амінокислоти (L-Тир) та k_{cat}/K_m неспорідненої (D-Тир)), що характеризує субстратну специфічність ферменту, суттєво не відрізнявся під час реакції аміноацилювання: 24 – на першому етапі, утворення аміноацил-аденілату, та 19 – на другому етапі, утворення аміноацил-тРНК (табл. 3). Такий рівень помилкового включення набагато вищий, ніж повідомлялося раніше для інших АРСаз (Bergmann et al., 1961). Тому помилково утворена сполука D-Тир-тРНК^{Tyr} потребує редагування додатковими факторами.

Таблиця 3

Стаціонарні параметри аміноацилювання для ТирРС при 60 °С¹

Тир	k_{cat} (с ⁻¹)	K_m (мкМ)	k_{cat}/K_m (мкМ ⁻¹ с ⁻¹)	Фактор дискримінації ²
Реакція пірофосфатного (АТФ-ФФ _H) обміну				
L-Тир ²	17.36 ± 3.90	9 ± 2	1.93	1
D-Тир ³	2.20 ± 0.65**	27.6 ± 7.5	0.08**	24
Реакція аміноацилювання				
L-Тир ⁴	46.7 ± 6.7	3.70 ± 0.35	12.76	1
D-Тир ⁵	3.5 ± 0.2**	5.3 ± 0.5	0.66**	19

Примітки: ** P<0.005 (One-way ANOVA) порівняно зі значеннями для L-Тир

1. Наведені дані представляють середні значення ± SE (n = 3); [тРНК^{Tyr}] = 5 мкМ, [D-Тир] знаходилася в діапазоні від 0.5 до 200 мкМ, [L-Тир] – від 0.25 до 50 мкМ.

2. Фактор дискримінації = $(k_{cat}/K_m)_{L-Тир}$ (споріднена амінокислота) / $(k_{cat}/K_m)_{D-Тир}$ (неспоріднена)

3-6. ТирРС використовували у концентрації ³5 нМ, ⁴50 нМ, ⁵0.05 нМ, ⁶0.5 нМ.

Константа Міхаеліса-Ментен K_m для обох стереоізомерів у реакції аміноацилювання суттєво не відрізняється (3.7 ± 0.7 мкМ для L-Тир і 5.3 ± 1.0 мкМ

для D-Тир відповідно), що підтверджує подібність у розпізнаванні ТирРС та високу спорідненість обох енантіомерів Тир до фермента. Порівняно з кінетичними параметрами для реакції аміноацилювання, K_m для L-Тир і D-Тир на етапі активації амінокислоти (реакція пірофосфатного обміну) мали лише 2.4-кратне збільшення (9 ± 2 мкМ проти 3.7 ± 0.35 мкМ) для L-Тир і 5.2-кратне збільшення (27.6 ± 7.5 мкМ проти 5.3 ± 0.5 мкМ) для D-Тир.

Щоб з'ясувати роль гідроксильних груп кінцевого аденозину тРНК^{Тир} у приєднанні енантіомерів Тир, ми перевірили активність ТирРС на дикому типі тРНК^{Тир} та на його 2'dA76 або 3'dA76 похідних відповідно. Початкові швидкості аміноацилювання (V_o) всіх похідних тРНК^{Тир} визначали з нахилу лінійної ділянки кінетичної кривої швидкості руху (тангенс кута нахилу дотичної до кривої профілю реакції) у програмі OriginPro 8.5. k_{obs} за формулою: $k_{obs} = \frac{V_o}{[ТирРС]}$

Результати розрахунків спостережуваних стаціонарних констант швидкості реакції наведені у табл. 4. Обчислені каталітичні параметри показали, що за відсутності сусідньої ОН-групи L-Тир приєднується до 3'-ОН тРНК^{Тир} (2'dA76 тРНК^{Тир}) у 6.5 разів повільніше ($k_{obs} = 5.8$ с⁻¹) порівняно з диким типом A76 тРНК^{Тир} ($k_{obs} = 37.9$ с⁻¹), тоді як естерифікація 2'-ОН групи (3'dA76 тРНК^{Тир}) показала збільшення вдвічі k_{obs} (70.8 с⁻¹). Таким чином, L-Тир переважно зв'язується з 2'-ОН групою тРНК^{Тир}, що, як правило, важлива для аміноацилювання АРСазами класу I. Отримані результати свідчать про суттєву асиметрію приєднання D-Тир до тРНК^{Тир}, тоді як відмінності в аміноацилюванні по 2' та 3'-ОН групах L-Тир виявилися не настільки незначними. Результати щодо приєднання Тир, з одного боку, узгоджуються з відомою закономірністю для АРСаз класу I, згідно з якою амінокислоти в основному приєднуються до 2'-ОН групи тРНК. З іншого, вони також доповнюють попередні структурні прогнози з літературних джерел (Yaremchuk et al., 2002), підтверджуючи «подвійний» характер розпізнавання тРНК^{Тир} ТирРС.

Таблиця 4

Спостережні константи швидкості реакцій аміноацилювання тРНК^{Тир} та її 2' і 3'-дезоксипохідних у присутності ТирРС за стаціонарних умов при 60°C

Тир та тРНК ^{Тир}	k_{obs} (с ⁻¹)	$k_{obs}(с^{-1})_{L-Тир,A76} / k_{obs}(с^{-1})$	$k_{obs}(с^{-1})_{D-Тир,A76} / k_{obs}(с^{-1})$
L-Тир, A76 ¹	37.9 ± 5.4	1	0.07**
D-Тир, A76 ²	2.8 ± 0.4	13.5**	1
L-Тир, 2'd ³	5.8 ± 0.5	6.5**	–
D-Тир, 2'd ⁴	0.0060 ± 0.0009	–	466.7**
L-Тир, 3'd ⁵	70.8 ± 5.9	0.54*	–
D-Тир, 3'd ⁶	16.8 ± 2.3	–	0.17**

Примітки: *P<0.05 (One-way ANOVA), **P<0.005 (One-way ANOVA) у порівнянні з параметрами для L-Тир, A76 (для D-Тир вимірювань) і навпаки.

1-6. Фермент тестували за концентрацій ¹0.05 нМ, ²0.5 нМ, ³0.25 нМ, ⁴500 нМ, ⁵0.025 нМ, ⁶0.05 нМ.

Отже, в нашій роботі вперше було показано, що місцем аміноацилювання D-Тир є 2'-ОН група тРНК^{Тир}, у свою чергу L-Тир майже з однаковою ймовірністю приєднується як до 2'-ОН, так і до 3'-ОН групи тРНК^{Тир}.

Вивчення активного центру ДТД методом сайт-спрямованого мутагенезу. Оскільки кристалічна структура ДТД залишається нез'ясованою, для моделювання механізму редагування ДТД *T. thermophilus* та пошуку амінокислотних залишків в активному сайті колегою з відділу ензимології білкового синтезу (н.с. Раєвським О. В.) було виконано симуляцію молекулярної динаміки (МД) з D-Тир-тРНК^{Тир} у комплексі з ферментом. Перед цим передбачення структури димеру ДТД було проведено у два етапи на основі результатів множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей та пошуку просторового шаблону для моделювання мономеру та димеру. Координати кристалічних структур білків, наявних у базі даних PDB (PDB ID: 2DBO з роздільною здатністю 2,76 Å та 1JKE з роздільною здатністю 1,55 Å відповідно) були використані як шаблони для передбачення структури мономерних молекул з *T. thermophilus* на сервері Swiss model. Єдиною структурою, яка представлена в димерному стані, є ДТД з *P. falciparum* (PDB ID: 3KNF, роздільна здатність – 3Å). Таким чином, димерний комплекс ДТД був сформований за допомогою простого просторового вирівнювання одного мономеру до кожної субодиниці структури шаблону (3KNF). Для підтвердження якості змодельованої структури було проведено симуляцію МД апо-ферменту. За результатами МД комплексу ферменту з D-Тир-тРНК^{Тир}, сайт зв'язування ДТД сформований двома паттернами: з амінокислотних залишків першої субодиниці (Leu31, Val33, Val76, Ser77, Gln78, Phe79, Tyr82, Ala96, Ala97, Pro98, Tyr106, Tyr125, Gly126, Ala127, His128, Met129, Arg130, і Val131) та другої субодиниці (Met62, Gly137, Pro138 і Val139) (рис. 8).

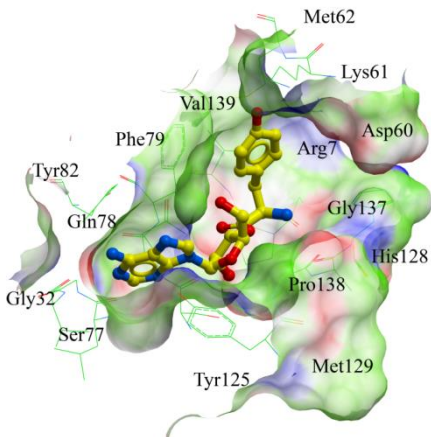


Рис. 8. Структурна організація активного центру ДТД *T. thermophilus* після симуляції МД

Сайт-спрямований мутагенез гена ДТД проводили за допомогою методу QuickChangeTM, розробленого Stratagene (La Jolla, США). Результати були перевірені секвенуванням ДНК отриманих клонів. За результатами симуляції МД після 5 нс та порівняння послідовностей ДТД різних організмів було обрано кілька амінокислот для перевірки запропонованої моделі активного центру ДТД. Шість відібраних амінокислот розташовувались у двох висококонсервативних ділянках; (1) SFQL-мотиві (S77, Q78 та F79) та (2) консервативному енантіоселективному GPVT-мотиві (G137, P138, V139) (Kuncha et al., 2018). V124 та A127 було вибрано з огляду на їхню можливу роль у позиціонуванні чи активації молекули води, знайденої в нашій моделі. Крім того, було модифіковано Y125, який відповідає абсолютно консервативному фенілаланільновому залишку в інших бактеріальних ДТД. Загалом 12 однозаміщених мутантних форм ДТД (S77A, Q78A, F99A, V124A, Y125A, Y125F, A127V, A127M, G137A, P138A, P138H, V139A) було отримано шляхом заміни

амінокислот і протестовано на здатність до редагування помилково аміноацильованих тРНК. Для оцінки стереоспецифічності мутантних ДТД щодо D-Тир-тРНК^{Тир} та L-Тир-тРНК^{Тир} 0.25 мкМ субстрату (у концентрації $\ll K_m$) інкубували з 250 нМ фермента при 37 °С протягом 20 хв. Варто зауважити, що всі мутантні форми ДТД відзначалися відсутністю гідролітичної активності щодо L-Тир-тРНК^{Тир}, що свідчить про їхню стійку енантіоселективність. Темпи гідролізу D-Тир-тРНК^{Тир} мутантними формами ДТД порівнювали зі швидкістю гідролізу ДТД дикого типу (WT).

Для визначення стаціонарних констант швидкості гідролізу D-Тир-тРНК^{Тир} мутантними ДТД білків (k_{obs}) провели деацильовання з високими концентраціями D-Тир-тРНК^{Тир} (3 мкМ) та 200 нМ ферментом. Константи (k_{obs}) визначали за формулою: $k_{obs} = \frac{V_o(hydrolysis)}{[ДТД]}$. Результати представлені на рис. 9.

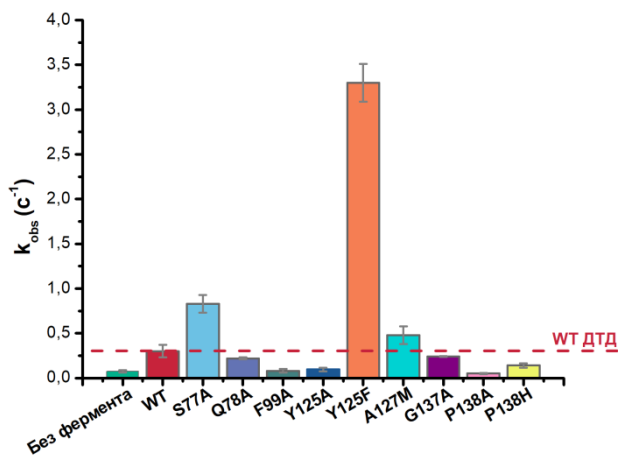


Рис. 9. Гідроліз D-Тир-тРНК^{Тир} у присутності WT ДТД та його мутантних форм при 37 °С

Найбільш виражений ефект спостерігався при заміні Y125 на F, внаслідок якого активність редагування зросла в 11 разів. Зміни в активності інших мутантів знаходилися в діапазоні від двох до шести разів. Одним із можливих пояснень ефекту з мутантним білком Y125F є більш висока гідрофобність фенілаланінового

кільця порівняно з тирозином. Фенільне кільце F125 знаходиться у вандерваальсовому контакті з гідрофобним краєм рибози в положенні C1 у A76, що примикає до важливих для каталізу груп, і ця конкретна СН/π взаємодія повинна бути сильнішою за таку для залишків тирозину або аланіну. Такі СН/π взаємодії широко розповсюджені у вуглеводнево-білкових комплексах (Spiwok et al, 2017). Виходячи з цих даних, припускаємо, що залишок F, який є консервативним в активному центрі більшості ДТД, бере участь у механізмі деацильовання. Можливо, Y125 (як і F125) також є важливим (але менш ефективним) учасником стабілізації перехідного стану.

Таким чином, дослідження за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу послугувало експериментальною основою для ідентифікації сайту зв'язування ДТД з субстратом. Наприклад, заміна амінокислот, які беруть участь у стабілізації субстрату шляхом стекінгових взаємодій (F79A) або є відповідальними за енантіоселективність (G137A та P138A) – призводили до зниження активності деацильовання від трьох до шести разів. З іншого боку, ми не знайшли амінокислотних залишків ДТД *T. thermophilus*, чії бічні ланцюги були б потенційними кандидатами для безпосередньої участі в реакції гідролізу.

Роль тРНК^{Тир} у процесі гідролізу D-Тир-тРНК^{Тир}. Для дослідження участі гідроксильних груп тРНК^{Тир} у процесі деацильовання за участі ДТД *T. thermophilus*, ми проводили біохімічні експерименти з різними помилково аміноацильованими D-

Тир-тРНК^{Тир} (2'dA76 або 3'dA76 та тРНК^{Тир} дикого типу). Було підтверджено важливість наявності сусідніх гідроксильних груп тРНК^{Тир} для гідролізу помилкових субстратів. Важливо зауважити, що на відміну від D-Тир-тРНК^{Тир}, деацильовання помилково аміноацильованих варіантів D-Тир-2'dA76 тРНК^{Тир} та D-Тир-3'dA76 тРНК^{Тир} за низьких концентрацій (0.25 мкМ) не відбувалося навіть при значному надлишку фермента – 10 мкМ ДТД (Rybak et al., 2018). Як відомо, 2'-гідроксильна група A76 тРНК^{Тир} – проксимальна полярна група до аміноацильного складноєфірного зв'язку. Можливе пояснення її участі в деацильованні гліцину було представлено раніше (Routh et al., 2016). Ми спостерігали, що ДТД каталізує деацильовання специфічно з 3'-ОН групи, а вільна 2'-ОН група сприяє цьому гідролізу (Rybak et al., 2018). D-Тир-тРНК^{Тир} швидко деацильюється, тоді як D-Тир-2'dA76 тРНК^{Тир} (без інтактною 2'-ОН групи) практично не демонструють деацильовання. Після інкубації 0.25 мкМ помилково зарядженої D-Тир-2'dA76 тРНК^{Тир} з 10 мкМ ДТД або його мутантною формою Y125F вона залишалася майже на 100% аміноацильованою (рис. 10).

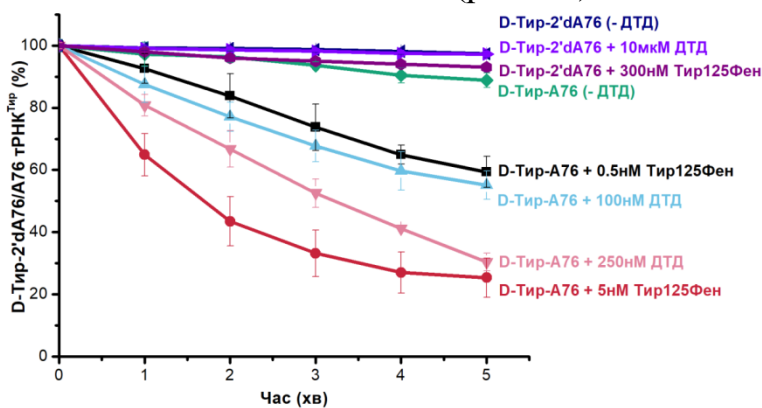


Рис. 10. Кінетика деацильовання D-Тир-тРНК^{Тир} та D-Тир-2'dA76 тРНК^{Тир} за участі ДТД (WT) та ДТД (Y125F) при 37 °C. Концентрації субстратів D-Тир-A76/2'dA76 тРНК^{Тир} склали 0.25 мкМ. Дані представлені як середнє значення з трьох незалежних повторів \pm SD

На протипагу цьому, за тих же умов, D-Тир-тРНК^{Тир} була майже повністю деацильована. Згідно з нашими даними, ТирРС специфічно приєднує D-Тир до 2'-ОН групи A76 тРНК^{Тир}, після чого для реакції гідролізу за участі ДТД цей субстрат переноситься на 3'-ОН групу; вільна 2'-ОН група A76 критично важлива для деацильовання ДТД, про що свідчать наші біохімічні та квантово-хімічні дані (табл. 5), а також результати ЯМР-аналізу групи Р. Санкарараяна (Ahmad et al., 2013).

На основі отриманих даних можна зробити висновок про те, що заміщення однієї 2'-ОН функціональної групи призводять щонайменше до 1000-кратного зниження ефективності деацильовання у присутності ДТД, що відповідає мінімальній різниці в енергії активації, яка становить приблизно 5 ккал/моль.

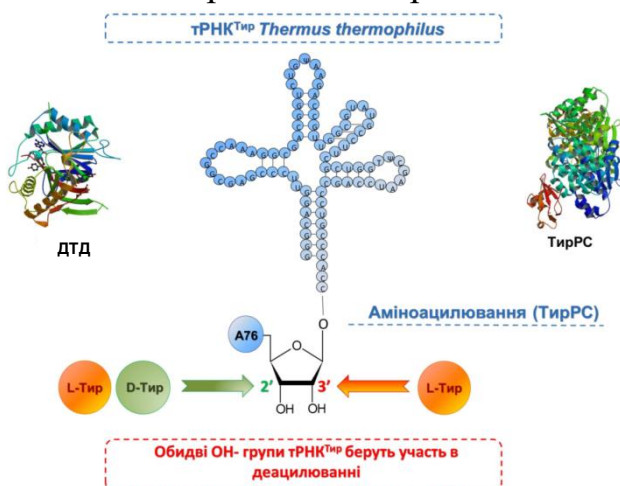


Рис. 11. Роль ОН-груп A76 тРНК^{Тир} у процесі помилкової трансляції D-Тир. Для підготовки схеми були використані pdb структури ТирРС *T. thermophilus* (10.2210 / pdb1h3f / pdb) та ДТД *P. falciparum* (10.2210 / pdb4nbi / pdb) (<http://www.rcsb.org/>). Адаптовано з (Rybak et al., 2018)

Отже, вперше було показано, що для початкових етапів контролю якості трансляції 2'-ОН група тРНК^{Тир} виконує подвійну роль. З одного боку, вона є первинним сайтом для аміноацилювання D-Тир, з іншого, – 2'-ОН строго необхідна для гідролізу помилково утвореного D-Тир-тРНК^{Тир}, навіть якщо залишок амінокислоти приєднаний до 3'-положення рибози А76 (рис. 11).

Посттрансферне редагування помилково синтезованих D-аланіл-тРНК^{Ала} за участі АлаРС. Для перевірки здатності АлаРС гідролізувати помилково активовані тРНК^{Ала}, були проведені експерименти з деацилювання за участі [³²P]-Глі/D-Ала-тРНК^{Ала} та 500 нМ АлаРС *T. thermophilus* порівняно з гідролізом L-Ала-тРНК^{Ала}. Паралельно було перевірено також активність ДТД (WT) та її мутантної форми Y125F щодо гідролізу тРНК^{Ала}, заряджених D-Ала. Порівняно з ДТД (WT), мутантна форма Y125F проявляла 270-кратне збільшення каталітичної швидкості деацилювання субстратів D-Тир-тРНК^{Тир} (Pchenko, Rybak et al., 2019). А отже, важливим було перевірити її активність щодо D-Ала та L-Ала-тРНК^{Ала}. На рис. 11 представлено кінетичні криві деацилювання всіх перевірених субстратів. Неочікувано, що АлаРС показала найвищу швидкість гідролізу стосовно D-Ала-тРНК^{Ала} (80% субстрату було гідролізовано за 30 хв) на відміну від дещо нижчої швидкості гідролізу L-Ала/Глі-тРНК^{Ала} (60% субстрату – за 30 хв) (рис. 12).

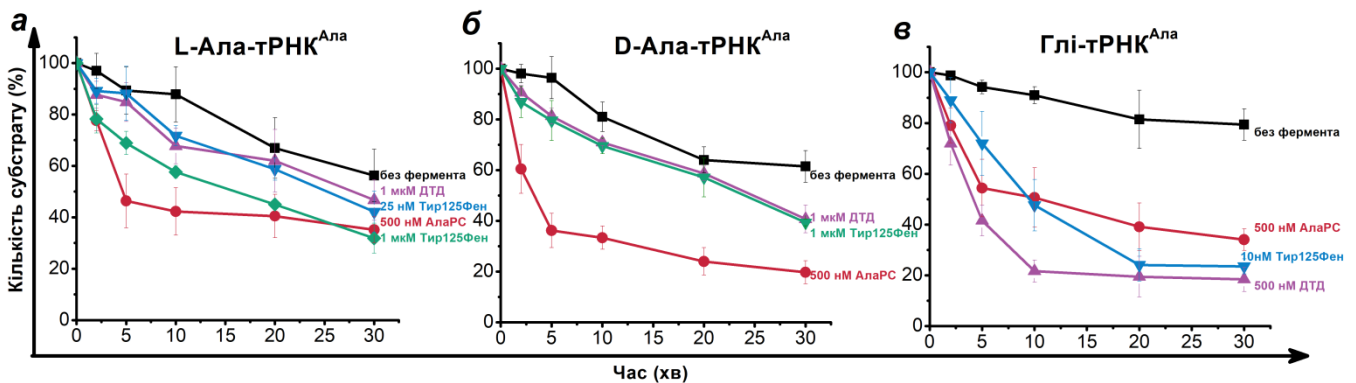


Рис. 12. Кінетика деацилювання L-Ала-тРНК^{Ала} (а), D-Ала-тРНК^{Ала} (б), Глі-тРНК^{Ала} (в) за участі АлаРС (WT) та ДТД (WT) та його мутантної форми Y125F при 37 °С (рН 7.5). Концентрація всіх субстратів становила 0,25 мкМ. Дані відповідають середнім значенням із стандартною похибкою вимірювання (SE) із трьох незалежних експериментів

Припускаємо, що таким чином редагувальний домен АлаРС *T. thermophilus* також відповідає за контроль стереоспецифічності амінокислот. На відміну від АлаРС, ДТД (як дикий тип, так і його більш активна мутантна форма Y125F) не виявляли гідролітичної активності щодо помилково ацильованих тРНК^{Ала} з D-Ала. Однак фермент демонстрував помітні показники гідролізу для Глі-тРНК^{Ала}. Факт гідролізу субстратів з Глі-тРНК^{Ала} вперше був описаний для деацилаз *Plasmodium falciparum* (Routh et al., 2016) та *E. coli* (Pawar et al., 2017). Відповідно до кривих деацилювання L-Ала-тРНК^{Ала}, ДТД (WT) *T. thermophilus* виявляла низький рівень гідролізу (приблизно 10% гідролізованих L-Ала-тРНК^{Ала} субстратів) навіть за високої концентрації фермента – 1 мкМ; в свою чергу його Y125F мутантна форма (1 мкМ) відображала удвічі вищий рівень гідролізу. Таким чином, наші результати

узгоджуються з відомими літературними даними та свідчать про цікавий феномен відсутності редагувальної активності ДТД щодо D-Ала-тРНК^{Ала}.

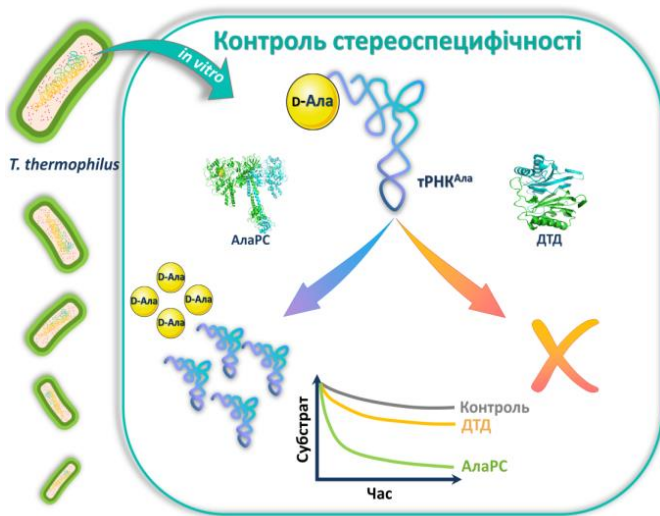


Рис. 13. Схема стереоспецифічного контролю за участі ДТД та АлаРС. Адаптовано з (Rybak et al., 2019)

Важливо зазначити, що механізми деацилювання тРНК^{Ала}, активованих D-Ала, раніше не були описані. Це дослідження виявило досі невідому функцію редагувального домену АлаРС в хіральному контролі під час трансляції (рис. 13). Дані вказують на те, що АлаРС ефективно гідролізує помилково ацильовані субстрати D-Ала-тРНК^{Ала} (рис. 12).

Механізм гідролізу D-аміноацил-тРНК за участі ДТД *T. thermophilus*. Аналіз експериментальних даних та розрахунків на основі комп'ютерного квантово-механічного моделювання процесу деацилювання. Отримана в результаті симуляції МД модель залишку D-тирозил-А76 в активному центрі ДТД була використана співробітниками відділу синтетичних біорегуляторів Інституту молекулярної біології та генетики НАНУ (к.х.н. Ільченком М. М. та д.х.н. Дубеєм І. Я.) для квантово-хімічних розрахунків (QM) механізму реакції гідролізу. Результати експериментальних та квантово-хімічних розрахунків представлені у спільній публікації з колегами (Pchenko, Rybak et al., 2019).

Відповідно до квантово-хімічних розрахунків, у гідролізі субстратів D-тирозил-А76 беруть участь дві молекули води (рис. 14). Наявність атакуючої (W1) та асистуючої (W2) молекул води суттєво знижувала енергетичний бар'єр, необхідний для ефективного гідролізу помилкових D-аміноацил-тРНК.

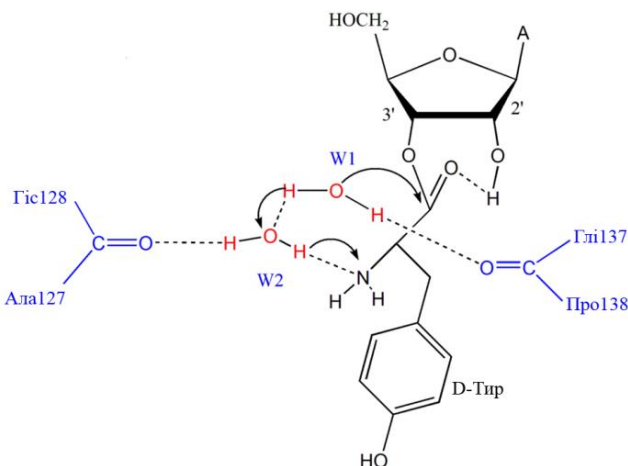


Рис. 14. Загальна схема гідролізу субстрату D-Тир-тРНК^{Тир}, що містить залишок Тир з непротонованою групою NH₂. W1 і W2 – атакуюча та асистуюча молекули води відповідно. Штрихові лінії являють собою водневі зв'язки. Показані лише залишки амінокислот, які безпосередньо беруть участь у процесі

Важливо, що у цьому механізмі аміногрупа D-тирозины непротонована: саме у такій формі ця група підвищує реактивність проксимальних молекул води на основі утворення більшої кількості нуклеофільних видів. Ключова роль 2'-гідроксильної групи рибози А76 тРНК^{Тир} у відщепленні залишка D-тирозины полягає в утворенні внутрішньомолекулярного

водневого зв'язку з карбонільною групою D-тирози́ну, що важливий для перебудови атомів у перехідному стані та формування проміжного продукту реакції. Енергетичні параметри описаного механізму реакції були також розраховані для аналога субстрату, де 2'-ОН кінцевої рибози був заміщений атомом гідрогену (аденозин \rightarrow 2'-дезоксааденозин). У цьому випадку координація тирозинового карбонілу 2'-ОН групою на всіх етапах процесу очевидно неможлива. Енергія активації, ΔE^\ddagger , лімітуючої стадії реакції зростає тут від 10.51 до 15.01 ккал/моль, тобто на 5.5 ккал/моль (табл. 5) і добре відповідає експериментальним даним (~5 ккал/моль) (рис. 10).

Досліджений механізм значно відрізняється від запропонованих раніше тРНК-асистованих пост-трансферних механізмів редагування, що постулювали роль 2'- та 3'-ОН груп А76-тРНК в активації нуклеофільної молекули води для ініціювання гідролізу в ФенРС (Ling et al., 2007; Tworowski et al., 2015), ПроРС (Kumar et al., 2012), ЛейРС (Nagiwara et al., 2010; Voero et al., 2011), архейній ТреРС (Ahmad et al., 2015), та ДТД *Plasmodium falciparum* (Ahmad et al., 2013).

Таблиця 5

Енергетичні параметри реакції гідролізу D-тирозил-тРНК^{Тир} (Pchenko, Rybak et al., 2019)

Структура	2'-замісник рибози	ΔE^\ddagger , ккал/моль
TS1	ОН	10.51
	Н	15.01
TS2	ОН	2.49
	Н	2.78

Примітки: * ΔE^\ddagger та ΔG^\ddagger – енергії активації, обчислені як різниця між відповідними значеннями E_{tot} (повної енергії електронів) або G^{310} (вільної енергії Гіббса при $T = 310\text{K}$) відповідно

Механізми редагування у цих системах ґрунтувалися на розрахунках із використанням підходу QM/MM (гібридних квантово-хімічних/розрахунків молекулярної динаміки), недоліком якого була дуже обмежена частина QM (зазвичай 70-90 атомів). На противагу цьому, використовуючи повний метод QM із більш всеохоплюючою моделлю редагування для ПроРС, яка містила 480 атомів (Boyarshin et al., 2016), було визначено перехідний стан реакції та показано альтернативний механізм гідролізу. У цьому каталітичному механізмі 2'-ОН група аденозину 76 утворює внутрішньомолекулярний водневий зв'язок із карбонільною групою аланінового залишку, сильно полегшуючи гідроліз. Ми також показали значення утворення такого водневого зв'язку для гідролізу помилково ацильованих D-Тир-тРНК^{Тир} за участі ДТД, використовуючи систему для обчислень QM, що містила 276 атомів. Отже, було досліджено механізм гідролізу помилково ацильованих D-Тир-тРНК^{Тир} за участі D-аміноацил-тРНК-деацилази *T. thermophilus* з використанням методів молекулярного моделювання, симуляцій МД, квантово-хімічних розрахунків, сайт-направленого мутагенезу ферменту та модифікацій тРНК. Виходячи з отриманих результатів, ми пропонуємо новий субстрат-асистований механізм деацилювання, в гідролітичному процесі якого залучено кілька елементів аміноацил-тРНК.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі було з'ясовано роль тирозил- та аланіл-тРНК-синтетаз, а також D-аміноацил-тРНК-деацилази *T. thermophilus* у стереоспецифічному відборі амінокислот на дорибосомному етапі трансляції. Встановлено механізм гідролізу помилково аміноацильованих D-Тир-тРНК^{Тир} субстратів за участі ДТД.

1. Розроблено двостадійну методику очистки АлаРС(6xГіс), що включає афінну та гель-фільтраційну хроматографії для отримання препаративних кількостей фермента.

2. Клоновано ген ДТД, розроблено методику його експресії та очищення цільового білка у препаративних кількостях.

3. Уперше показано, що D-Ала та D-Сер активуються АлаРС та можуть приєднуватися до тРНК^{Ала}.

4. Уперше встановлено сайти приєднання L- та D-Тир до тРНК^{Тир} за участі ТирРС.

5. Показано, що жоден із бічних радикалів амінокислот з активного сайту ДТД не бере участі у каталізі, натомість підтверджено роль гідроксильних груп тРНК у процесі гідролізу. Експериментальні дані повністю збігаються з запропонованою квантово-хімічною моделлю гідролізу D-аміноацил-тРНК за участі ДТД, в якій беруть участь дві молекули води та важливим є лише основний ланцюг карбонільних груп амінокислот Gly137-Pro138 та Ala127-His128 цього ферменту.

6. Уперше показано подвійну роль 2'-ОН групи тРНК^{Тир}, що полягає в активації D-Тир ТирРС та в асистуванні ДТД-опосередкованого гідролізу D-Тир-тРНК^{Тир}.

7. Уперше встановлено, що редагувальний домен АлаРС відповідає за контроль стереоспецифічності, гідролізуючи D-Ала-тРНК^{Ала}.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Kryklyvyi I., Tukalo M. (2015) Cloning, expression and purification of D-Tyr-tRNA^{Tyr}-deacylase from *Thermus thermophilus*. *Biopolymers & Cell*, 31 (3), 179-186. DOI: 10.7124/bc.0008DE. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, переклоування гена деацилази у вектор *pProExHTb*, підбір умов експресії та очищення ензиму, обробка результатів, написання статті та підготування її до друку).

2. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O. P., Tukalo M. A. (2018) The Dual Role of the 2'-OH Group of A76 tRNA^{Tyr} in the Prevention of D-tyrosine Mistranslation. *Journal of molecular biology*, 430 (17), 2670-2676. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.06.036. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, отримання препаратів тРНК^{Тир}, біохімічні тестування, обробка результатів, написання статті та підготування її до друку).

3. **Rybak M. Yu.**, Priss A., Gudzera O., Kovalchuk A., Kryklyvyi I., Tukalo M. (2018) Expression and purification of full-length Alanyl-tRNA-synthetase from *Thermus thermophilus* HB27. *Biopolymers and Cell*, 34(6): 435-444. DOI: 10.7124/bc.00098E. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, очищення ензиму з His-тагом,

визначення молекулярної маси, перевірка активності, обробка результатів, написання статті та підготування її до друку).

4. Ilchenko M., **Rybak M. Yu.**, Rayevsky A., Kovalenko O., Dubey I., Tukalo M. (2019) Substrate-assisted mechanism of catalytic hydrolysis of misaminoacylated tRNA required for protein synthesis fidelity. *Biochemical Journal*, 476 (4), 719-732. DOI: 10.1042/BCJ20180910. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, отримання мутантних форм деацилази (мутагенез, очищення білків) та модифікованих препаратів тРНК^{Tyr}, біохімічні тестування, обробка результатів, участь у написанні статті та підготуванні її до друку).

5. **Rybak M. Yu.**, Rayevsky A., Gudzera O., Tukalo M. (2019) Stereospecificity control in aminoacyl-tRNA-synthetases: new evidence of D-amino acids activation and editing. *Nucleic acids research*, 47 (18), 9777-9788. DOI: 10.1093/nar/gkz756. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, отримання препаратів деацилази, аланіл-тРНК-синтетази, мічення тРНК^{Ala}, біохімічні тестування, обробка результатів, написання статті та підготування її до друку).

6. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2014 October) Cloning, expression and purification of D-Tyr-tRNA^{Tyr}-deacylase (DTD) from *Thermus thermophilus*. – Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 6-10 жовтня 2014, Київ (Опубл. в *Ukr. Biochem. J.*, 2014, Vol.86, №5 (Suppl. 1), P.74-75).

7. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O. P., Kriklivyi I. A., Tukalo M. A. (2015 May) Cloning, expression and purification of D-Tyr-tRNA^{Tyr}-deacylase from *Thermus thermophilus*. – Materials of IX annual Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU dedicated to 160th Anniversary of M. F. Kastschenko (Опубл. в *Biopolym. Cell*, 2015; 31 (Special Issue), P.9) – 1st place oral talk award.

8. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2015 September) D-Tyr-tRNA^{Tyr}-deacylase from *Thermus thermophilus* (DTDDTT): cloning, expression, purification and detection of editing activity. – International Conference of the Young Scientists (CYS-2015), 21-25 September, Kyiv (Опубл. в *Abstract book*, P. 40) – 2nd place oral talk award.

9. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2016 May) Molecular basis for proposed mechanism of editing activity by D-aminoacyl-tRNA-deacylase from *Thermus thermophilus*. – X Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, 26-27 May 2016, Kyiv (Опубл. в *Biopolymers and Cell*, 2016, Vol. 32, № 5, P. 403) – 1st place oral talk award.

10. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2016 July) The pathway of D-Tyr in *Thermus thermophilus* aminoacylation and deacylation steps. – X Parnas Conference, Young Scientific Forum “Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine” 10-12 July 2016, Wroclaw, Poland (Опубл. в *Acta biochimica polonica*, Vol. 63, Suppl., 1/2016, Abstracts P. 43).

11. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2016 September) Molecular basis for mechanism of editing activity by D-aminoacyl-tRNA-deacylase from *Thermus thermophilus*. – Materials of the IX International meeting “From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies”, 20-22 September 2016, Lviv, Ukraine (Опубл. в *Biopolymers and Cell*, 2016, Vol. 32, № 4, P. 317).

12. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Rayevsky A., Tukalo M. (2017 June) Mutagenesis probe into editing mechanism of D-aminoacyl-tRNA deacylase from *T. thermophilus*. – Joint Meeting of the 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and

Biotechnology” & 2nd Conference for young scientists of the division of Biochemistry, physiology and Molecular Biology NAS of Ukraine (CYS-2017), 6-9 June 2017, Kyiv (Опубл. в *Ukr. Biochem. J.*, 2017, Vol. 89, №3, P. 108. DOI: 10.15407/ubj89.03). – 3rd place oral talk award.

13. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Rayevsky A., Tukalo M. (2017 September) 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”, 10-14 September, Jerusalem, Israel (Опубл. в *FEBS journal* 2017, 284, 293-294. DOI: 10.1111/febs.14174).

14. **Rybak M. Yu.** (2018 May) The role of 2'- and 3'-hydroxyl groups of A76 tRNA^{Tyr} at the first steps of translation quality control. – Конференція молодих вчених “Актуальні аспекти біохімії та біотехнології – 2018”, 23–25 травня 2018, Київ (Опубл. в *Ukr. Biochem. J.*, 2018, Vol. 90, № 3, P.133) – special oral talk award.

15. **Rybak M. Yu.**, Tukalo M. A. (2018 September) Chirality during protein biosynthesis: the role of hydroxyl groups of tRNA^{Tyr} in D-Tyr aminoacylation and proofreading reactions against its involvement in translation. – The FEBS3+ Meeting – XI Parnas Conference "Biochemistry and molecular biology for innovative medicine" (3-5 September 2018, Kyiv, Ukraine (Опубл. в *Ukr. Biochem. J.*, 2018, Vol. 90, Special Issue, P. 145).

16. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O. P., Rayevsky A. V., Ilchenko M. M., Tukalo M. A. (2018 September) D-aminoacyl-tRNA-deacylase: an essential enzyme for protein quality control during translation initiation. – EMBO Workshop «Enzyme, biocatalysis and chemical biology: The new frontiers», 09-12 September 2018, Pavia, Italy (Опубл. в *Abstract book*, P. 61).

17. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2018 September) The dual role of the 2'-OH group of A76 tRNA^{Tyr} in the discrimination of D-Tyrosine during the first steps of translation. – 27th tRNA Conference, 23-28 September 2018, Strasbourg, France (Опубл. в *Abstract book*, P.186) – flash talk.

18. Tukalo M., Kovalenko O., **Rybak M. Yu.**, Rayevsky A., Ilchenko M., Gudzera O., Kriklivyi I., Yaremchuk G., Dubey I. (2018 September) tRNA-dependent mechanism of the errors editing in translation quality control. – 27th tRNA Conference, 23-28 September 2018, Strasbourg, France (Опубл. в *Abstract book*, P.190).

19. **Rybak M. Yu.**, Kovalchuk A., Volynets G. (2018 November) Quality control during protein biosynthesis: from fundamental principles to new therapeutic targets. – XIII International Young Scientists' Conference "Biology: from a molecule up to the biosphere", 28-30 November 2018, Kharkiv, Ukraine (Опубл. в *Abstract book*, P.7-8) – Plenary lecture.

20. **Rybak M. Yu.**, Volynets G., Kovalenko O., Starosyla S., Bdzholo V., Gudzera O., Yarmoluk S. and Tukalo M. (2019 June) Dual-targeted aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors to overcome antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. – FEBS Practical Course: Biomolecules in Action II, 23-28 June, Hamburg, Germany (Опубл. в *Abstract book*, P. 87) – 1st place poster prize award.

21. **Rybak M. Yu.**, Rayevsky A. V., Tukalo M. A. (2019 October) Establishing of the chiral selectivity in translation apparatus: the role of *cis*- and *trans*-editing factors. – XII Український біохімічний конгрес, присвячений 165-й річниці від дня народження

І. Я. Горбачевського, 30 вересня-4 жовтня 2019, Тернопіль (Опубл. в *Медицина та клінічна хімія*, Т. 21. №3 (додаток). – С. 43-44. – Oral talk award.

22. Tuko M., Kovalenko O., **Rybak M.**, Rayevskiy A., Dubey I., Gudzera O., Krikliiviy I., Yaremchuk A. (2019 November) Quality control of nonproteinogenic amino acids: substrate-assisted mechanisms of the errors editing. – 12th International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetases, 5-9 November 2019, Hangzhou, China. (Опубл. в *Abstract book*, P. 21).

АНОТАЦІЯ

Рибак М. Ю. Роль аміноацил-тРНК синтетаз та D-аміноацил-тРНК деацилази у забезпеченні стереоспецифічної селекції амінокислот у процесі трансляції. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.03 «Молекулярна біологія». – Інститут молекулярної біології та генетики Національної академії наук України, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена вивченню ролі тирозил- та аланіл-тРНК синтетаз, представників I та II структурних класів відповідно, а також додаткового редагувального фактора D-аміноацил-тРНК-деацилази у контролі стереоселективності амінокислот на дорибосомному етапі трансляції. Встановлено, що D-амінокислоти мають різний рівень афінності та ймовірність активації у APCаз I та II класу. Вперше показано, що 2'-ОН група тРНК^{Тир} відіграє подвійну роль: з одного боку, вона є сайтом приєднання D-тироzinу за участі тирозил-тРНК синтетази, а з іншого, – необхідна для гідролізу D-аміноацил-тРНК за допомогою D-аміноацил-тРНК-деацилази. Таким чином, було встановлено, що ключовим фактором для гідролізу D-аміноацил-тРНК за участі цього фермента є наявність 2'-ОН групи кінцевого A76 D-Тир-тРНК^{Тир} та двох молекул води. Уперше з'ясовано роль редагувального домену АлаРС у забезпеченні стереоспецифічної селекції амінокислоти.

У дисертаційній роботі досліджено, що АлаРС, як представник II класу APCаз, також може як активувати D-амінокислоти, так і редагувати ці помилки енантіоселективного відбору. Розкрито також механізм гідролізу D-аміноацил-тРНК за участі *транс*-редагувального фактора ДТД та показано роль тРНК у цьому каталізі.

Ключові слова: біосинтез білка, хіральність, тРНК, аміноацил-тРНК-синтетази, тирозил-тРНК-синтетаза, аланіл-тРНК-синтетаза, D-амінокислоти, D-аміноацил-тРНК-деацилаза.

SUMMARY

Rybak M. Yu. Role of aminoacyl-tRNA-synthetases and D-aminoacyl-tRNA-deacylase in the providing of amino acids stereospecific selection during translation. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, specialty 03.00.03 – Molecular Biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

Present PhD thesis highlights the role of aminoacyl-tRNA synthetases from structural classes I and II, as well as additional editing protein D-aminoacyl-tRNA-deacylase, in the control of the amino acids stereoselectivity at pre-ribosomal stages of translation.

The accuracy of translation is crucial for ensuring cellular homeostasis and maintaining cellular integrity. Noteworthy, the homochirality of synthesized proteins is determined by their composition: L-amino acids and achiral glycine. In contrast, D-amino acids are the components of bacterial cell walls and regulatory molecules in the nervous and humoral system in eukaryotes, etc., and their other physiological roles in biological systems have been recently evaluated. Therefore, ensuring of the correct selection of an appropriate amino acid enantiomer is critical for protein biosynthesis.

The cellular machinery has several checkpoints that ensure the selection of L-amino acids during translation. The first checkpoint is aminoacyl-tRNA synthetases (ARSases), which selectively activate only L-enantiomers of corresponding amino acids. Since the specificity of these enzymes is not absolute, some ARSases may mistakenly activate similar amino acids. Therefore, the second checkpoint is the editing of misactivated products, either in the editing domain of ARSase (*cis*-editing), if available, or with the assistance of additional *trans*-editing protein factors (family of AlaX proteins – homologs of the AlaRS editing domain, YbaK – free-standing protein that assists ProRS, and DTD – D-aminoacyl-tRNA-deacylase that hydrolyzes D-aminoacyl-tRNAs). Another checkpoint is the discrimination of L/D-substrates by the elongation factor Tu (EF-Tu) in bacteria and eEF-1A in archaea and eukaryotes. The last but not the least step is the control of noncognate and unnatural amino acids at the ribosomal level. Peptidyl-transferase site of ribosome is able to distinguish the nature of L/D-peptide, excluding D-amino acids from translation apparatus.

However, it is worth noting that the role of *cis*-editing factors in establishing of amino acid stereoselectivity during translation remains poorly investigated. Therefore, there is a necessity to study the stereospecificity of ARSases among different structural classes to elucidate the mechanisms of L-aminoacyl-tRNA selection. Hitherto, the potential of ARSases to edit D-aminoacyl-tRNA by their editing domains was unexplored. In addition, the mechanism of D-aminoacyl-tRNAs hydrolysis by DTD has not been extensively verified by experimental studies.

Therefore, in our work we aimed to study the role of two ARSases, representatives of classes I (TyrRS) and II (AlaRS), in the maintenance of stereospecificity in translation apparatus, and to elucidate the mechanism of hydrolysis of tRNAs, activated with D-amino acids, by DTD.

Taking into consideration the uniqueness of TyrRS in the recognition of Tyr enantiomers (its stereospecificity is the lowest among synthetases) and the ability to attach L-Tyr to both the 2'- and 3'-hydroxyl groups of the terminal (A76) adenosine of tRNA^{Tyr}, the selection of this synthetase is logical. The attachment sites of D-Tyr have not been clarified yet. In turn, AlaRS is an interesting representative of class II of ARSases; it may mistakenly activate achiral glycine and serine and it also contains an editing domain for correction of these errors. However, whether AlaRS could also activate the D-enantiomers of alanine and serine and edit noncognate D-aminoacylated substrates remained unknown.

Analysis of the kinetic parameters (k_{cat} and K_m) of activation of homologous and non-homologous amino acids in the ATP-pyrophosphate (ATP-PPi) exchange reaction revealed that *Thermus thermophilus* TyrRS (TyrRS) did not show any discrimination between D- and L-Tyr (discrimination factor was only 1:24). The absence of significant distinction of substrates was also observed at the stage of aminoacyl-tRNA^{Tyr} formation (1:19). Regarding AlaRS, it was shown for the first time that it may activate D-Ala and D-Ser with discrimination levels of 1:467 and 1:180 645, as well as to attach them to tRNA^{Ala}. The activation levels of Gly (1:193) and L-Ser (1:237) for AlaRSTT are consistent with those obtained for the mutant form of *E. coli* AlaRS (C666A), editing-deficient, and reach the ratio 1:207 and 1:107, respectively. Activation of D-Ala and D-Ser was also checked on *E. coli* AlaRS (C666A). It was shown that the inclusion levels of these amino acids are 1:333 and 1:67 416. These data overlap with the data on *T. thermophilus* AlaRS. Therefore, we found that D-amino acids have different levels of affinity and activation in class I and II ARSases.

Using modified at 2'- and 3'-positions of terminal adenosine of ribose (2'- and 3'-dA76 tRNA^{Tyr}) tRNA^{Tyr} and analysis of kinetic studies we elucidated the primary attachment site of D-Tyr to tRNA^{Tyr} and determined the role of last one during the hydrolysis of D-Tyr-tRNA^{Tyr}. We found that the 2'-OH group of tRNA^{Tyr} plays a dual role: on one hand, it is a D-Tyr attachment site by TyrRS and on the other, it is necessary for hydrolysis of D-aminoacyl-tRNA by DTD.

Analysis of *T. thermophilus* DTD (DTD) activity in deacylation reactions of A76/2'd/3'd-tRNA^{Tyr} substrates confirmed the importance of both hydroxyl groups of tRNA^{Tyr} for hydrolysis of D-Tyr-tRNA^{Tyr}. The data of computer simulations of D-Tyr-tRNA^{Tyr} in complex with DTD and proposed quantum-chemical model of hydrolysis of these complexes are in full agreement with experimental studies. We found that the key factor for hydrolysis of D-aminoacyl-tRNA by DTD is the presence of the 2'-OH group of the A76 residue of D-Tyr-tRNA^{Tyr} and two water molecules. We also showed the importance of the basic carbonyl groups of amino acids Gly137-Pro138 and Ala127-His128 of the enzyme. None of the amino acid side chains of the active site of DTD influences significantly on the mechanism of catalysis.

In biochemical testing with [³²P]-labelled tRNA^{Ala} (Gly/L-Ala/D-Ala-tRNA^{Ala}) we also found that AlaRS was able to perform effective hydrolysis of D-Ala-tRNA^{Ala} unlike DTD, which did not exhibit any hydrolytic ability. In contrast, Gly/L-Ala-tRNA^{Ala} was hydrolyzed by both synthetase and deacylase. Thus, we established the role of the AlaRS editing domain in providing amino acid stereospecific selection.

The results allowed us to suggest an evolutionary hypothesis of amino acid stereospecific selection in translation apparatus that takes into account the DTD activity.

In general, in PhD thesis it was shown that class II ARSases can also activate D-amino acids and edit the errors of enantioselective selection. The mechanism of hydrolysis of D-aminoacyl-tRNA by the *trans*-editing factor, DTD, was identified and the role of tRNA in this catalysis was demonstrated.

Key words: protein biosynthesis, chirality, tRNA, aminoacyl-tRNA-synthetase, tyrosine-tRNA-synthetase, alanyl-tRNA-synthetase, D-amino acids, D- aminoacyl-tRNA-deacylase.

ДЛЯ ПОДАТОК

ДЛЯ НОТАТОК