

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

**Бояршин Костянтин Сергійович**



УДК 577.217.32

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСНОВИ РЕДАГУЮЧОЇ АКТИВНОСТІ  
ПРОЦІЛ-ТРНК СИНТЕТАЗИ З *Enterococcus faecalis***

03.00.03 - молекулярна біологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

**дисертації на здобуття наукового ступеня**

**кандидата біологічних наук**

КИЇВ – 2016

Дисертацією є рукопис.

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

**Науковий керівник:** кандидат біологічних наук, с.н.с.  
**Яремчук Ганна Дмитрівна,**  
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України.

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Сиволоб Андрій Володимирович,**  
ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

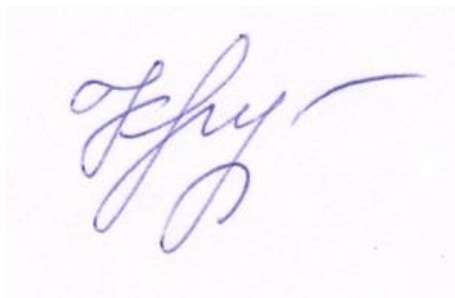
доктор біологічних наук, с.н.с.  
**Верьовка Сергій Вікторович,**  
ДУ "Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України", завідувач лабораторією біохімії.

Захист відбудеться «27» грудня 2016 року о 10<sup>30</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ-143, вул. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (03143, м. Київ-143, вул. Заболотного, 150).

Автореферат розіслано «\_\_» листопада 2016 року.

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



І.В. Крупська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Еволюційний розвиток генетичного коду супроводжувався встановленням однозначної відповідності між кодонами мРНК і амінокислотними залишками синтезованого поліпептидного ланцюга. Цей процес вимагав дивергенції аміноацил-тРНК синтетаз (АРС) і зростання їх специфічності. Спеціалізація кожного з цих ферментів на впізнаванні однієї окремої амінокислоти досягла рівня, який іноді називають надспецифічністю. Цей рівень забезпечується, зокрема, редагуванням.

Редагування помилок АРС – це специфічний гідроліз продуктів, що виникли внаслідок впізнавання ферментом помилкової амінокислоти. АРС використовують цілу низку механізмів редагування, різноманіття яких відображує еволюційний шлях становлення генетичного коду та зростання точності біосинтезу білка. Характеристика цих механізмів є одним з кроків до розуміння ранніх етапів розвитку життя.

Особливий інтерес викликає гідроліз помилкових кінцевих продуктів – аміноацил-тРНК, що зветься посттрансферним редагуванням. Зокрема, тут є приклади глибоких функціональних відмінностей у роботі гомологічних ферментів. Наприклад, на сьогодні відомо, що посттрансферне редагування у аланіл-тРНК синтетази (АлаРС) і треоніл-тРНК синтетази (ТреРС), незважаючи на їх гомологію (Beebe et al., 2003), відбувається за цілком різними механізмами. Так само по-різному гідролізують помилкові аміноацил-тРНК редагувальний домен проліл-тРНК синтетази (ПроРС) і гомологічна деацилаза YbaK (Kumar et al., 2012, Kumar et al., 2013). Накопичення даних про такі відмінності і їх подальше осмислення дозволять поглибити уявлення про шляхи функціональної дивергенції ферментів. З іншого боку, накопичення даних про окремі приклади редагування може дозволити визначити спільні особливості гідролізу АРС помилково синтезованих аміноацил-тРНК.

У редагуючих механізмах деяких АРС, у тому числі й ПроРС (Kumar et al., 2012), безпосередню участь беруть функціональні групи тРНК, що забезпечують ефективність каталізу деацилювання. Визначено низку прикладів РНК-білкового каталізу, проміжного між рибозимальним каталізмом і роботою більшості ферментів (Ling et al., 2007, Kang et al., 2012). Це поглиблює наші знання про біокаталіз, особливо у світлі уявлень про виникнення білкового життя зі «світу РНК».

Дані, отримані *in vivo* на прокаріотичних організмах (Cvetesic et al., 2014), підтверджують фізіологічну значущість редагування АРС. Це створює потенційну можливість використовувати речовини, що блокують редагувальні активні центри АРС у якості протимікробних препаратів. Також дані про редагувальні механізми можуть бути застосовані при розробці систем для синтезу штучних білків, що містять неприродні амінокислотні залишки, зокрема для забезпечення безпомилковості такого синтезу.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація відповідає тематиці науково-дослідних робіт відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ і виконувалася у рамках тем наукових досліджень 2.2.4.14 «Вивчення молекулярних механізмів корекційної

активності аміноацил-тРНК синтетаз» (2005-2009), номер державної реєстрації 0105U003263; 2.2.4.14 «Вивчення молекулярних основ точності трансляції генетичного коду в процесі утворення аміноацил-тРНК» (2010-2014), номер державної реєстрації 0109U007245.

**Мета і завдання досліджень.** Мета роботи - охарактеризувати механізми редагування ПроРС бактерії *Enterococcus faecalis* (ПроРС*Ef*) аланіл-тРНК<sup>Про</sup>.

Відповідно до мети роботи були поставлені наступні завдання:

1) Клонувати ген тРНК<sup>Про</sup> *Enterococcus faecalis* (тРНК<sup>Про</sup>*Ef*), розробити методику експресії і очищення транскрипта тРНК<sup>Про</sup>.

2) Для аналізу посттрансферної редагуючої активності створити гібридну тРНК<sup>ПроАла</sup>, здатну бути аміноацильованою АлаРС і деацильованою ПроРС шляхом посттрансферного редагування.

3) Оцінити внесок виборчого вивільнення аланіл-АМФ і його каталітичного розщеплення у претрансферне редагування ПроРС.

4) Перевірити вплив тРНК<sup>Про</sup> на ефективність претрансферного редагування і встановити її ключові структурні елементи, задіяні в цьому процесі, шляхом її модифікації.

5) Отримати набір мутантних форм ПроРС*Ef*, що несуть мутації у редагуючому домені, по амінокислотним залишкам, що можуть брати участь у процесі посттрансферного редагування, і експериментально оцінити їх функціональне значення.

6) Перевірити участь аланіл-тРНК<sup>Про</sup> у каталізі посттрансферного редагування ПроРС*Ef* і висунути припущення про характер її участі у цьому процесі, використовуючи експериментальні моделі на основі модифікованих тРНК.

7) Співставити отримані дані з комп'ютерною моделлю механізму посттрансферного редагування ПроРС*Ef* аланіл-тРНК<sup>Про</sup>, отриманою шляхом моделювання молекулярної динаміки і квантово-хімічних обчислень.

**Об'єкт дослідження** - механізми редагування ПроРС*Ef*.

**Предмет дослідження** - структурно-функціональна характеристика механізмів претрансферного і посттрансферного редагування ПроРС*Ef*.

**Методи дослідження** - сайт-спрямований мутагенез ПроРС*Ef* і тРНК<sup>Про</sup>, ферментативна модифікація тРНК, постановка ферментативних і неферментативних хімічних реакцій з радіоактивною міткою, зіставлення експериментальних результатів з результатами комп'ютерного моделювання.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше показане тРНК-залежне претрансферне редагування у АРС другого структурного класу. Показано провідну роль у цьому процесі гідроксильних груп А76 тРНК<sup>Про</sup>. Встановлено специфічну роль 2'-гідроксильної групи А76 тРНК<sup>Про</sup> в претрансферному редагуванні, що не зводиться до участі у зв'язуванні і позиціонуванні А76 тРНК<sup>Про</sup> у аміноацилюючому активному центрі.

Показано каталітичну природу тРНК-залежного і тРНК-незалежного претрансферного редагування ПроРС*Ef*, і часткове виборче вивільнення аланіл-АМФ за відсутності тРНК<sup>Про</sup>.

Проведено розширений сайт-спрямований мутагенез редагуючого активного центру ПроРСЕf по стратегії аланінового сканування, що дозволило встановити внесок різних амінокислотних залишків у посттрансферне редагування ПроРСЕf.

На двох різнорідних експериментальних моделях показано необхідність 2'-гідроксильної групи А76 тРНК<sup>Про</sup> для посттрансферного редагування ПроРСЕf.

Експериментально підтверджено нову квантово-хімічну модель посттрансферного редагування ПроРСЕf, що вперше була виконана на основі повнорозмірної моделі структури комплексу ПроРСЕf з аланіл-тРНК<sup>Про</sup> (Boyarshin et al., 2016), і істотно відмінна від запропонованої раніше (Kumar et al., 2012). Згідно з нею, каталіз гідролізу аланіл-тРНК<sup>Про</sup> йде за кислотно-основним субстрат-асистованим механізмом. Нуклеофільна атака зкоординованої молекули води полегшується водневим зв'язуванням всередині субстрату кисню карбонільної групи залишку аланіну з 2'-гідроксильною групою рибози А76 тРНК<sup>Про</sup>, що посилює відносний позитивний заряд на вуглеці карбонільної групи.

**Практичне значення отриманих результатів.** Отримані системи експресії і відпрацьовані методи очищення транскриптів тРНК<sup>Про</sup>Еf і тРНК<sup>Про</sup>Ала можуть слугувати для отримання препаратів цих тРНК з метою їх використання у подальших дослідженнях апарату білкового синтезу.

Дані про механізм посттрансферного редагування можуть бути використані для забезпечення редагування проти аланіна і проліна у процесі створення на основі ПроРС і тРНК<sup>Про</sup> ортогональних пар для введення в структуру синтезованих білків неканонічних амінокислот.

**Особистий внесок здобувача.** Оцінка літературних даних проведена дисертантом особисто. Створення геноінженерних конструкцій для експресії тРНК<sup>Про</sup>Еf і гібридної тРНК<sup>Про</sup>Ала, сайт-спрямований мутагенез гена ПроРСЕf, виділення і очищення транскрипта тРНК<sup>Про</sup>Ала, дикого типу і мутантних форм ПроРС, отримання препаратів аланіл-тРНК<sup>Про</sup>Ала і проліл-тРНК<sup>Про</sup>, у тому числі модифікованих, постановка ферментативних і неферментативних реакцій і аналіз отриманих даних були здійснені особисто здобувачем.

Очищення тРНК<sup>Про</sup>Еf і тРНК<sup>Про</sup> *Rhodopseudomonas palustris* (тРНК<sup>Про</sup>Рр) проводилося спільно з І. А. Крикливим. Автор висловлює подяку члену-кореспонденту НАН України М. А. Тукало за допомогу в розробці стратегії досліджень, аналізі та узагальненні результатів.

Слова щирої вдячності автор адресує безпосередньому керівнику роботи к.б.н. А. Д. Яремчук за керівництво, корисні поради та зауваження під час підготовки, проведення експериментів і при обговоренні результатів роботи. Отримані результати викладені в спільних публікаціях.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації доповідалися на ІХ Українському біохімічному з'їзді (Харків, Україна, 2006), 12-й Міжнародній Пушчінській школі-конференції молодих вчених (Пушціно, Росія, 2008), конференції «Мости у науках про життя» (Загреб, Хорватія, 2008), 1-й Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження у біології» (Донецьк, Україна, 2009), V Міжнародному симпозіумі «Надмолекулярні системи у хімії і біології» (Київ, Україна, 2009), VII Парнасівській конференції з біохімії і молекулярної біології (Ялта, Україна, 2009),

конференції молодих вчених ІМБГ НАНУ (Київ, Україна, 2010), конференції молодих вчених ІМБГ НАНУ (Київ, Україна, 2011), VI Міжнародній конференції молодих вчених (Харків, Україна, 2011), Форумі молодих вчених ФЕБО (Санкт-Петербург, Росія, 2013), XI Українському біохімічному з'їзді (Київ, Україна, 2014 року), 19-й Міжнародній Пушчінській школі-конференції молодих вчених (Пушціно, Росія, 2015).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 18 наукових робіт, з них 5 статей у рецензованих наукових журналах та тези 13 доповідей у збірниках матеріалів міжнародних і всеукраїнських наукових конференцій.

**Структура і обсяг роботи.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, експериментальної частини, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, який включає 134 найменування. Дисертація викладена на 142 сторінках машинописного тексту, вона містить 36 малюнків і 5 таблиць.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

### Матеріали і методи досліджень

У роботі використовували штами *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star, DH5 $\alpha$ , TOP10 і JM101, культивуючи їх на твердому і рідкому середовищах Лурія-Бертані, а також в калій-фосфатному середовищі і середовищі 2xTY.

Рекомбінантну ПроРС *Enterococcus faecalis* (ПроРС*Ef*) дикого типу і її мутантні форми експресували в культурах кишкової палички, штам BL21 (DE3) Star. Клітини осаджували, лізували за допомогою ультразвукового дезінтегратора, білки в освітленому лізаті піддавали ступінчатому висолюванню сульфатом амонію. Очищення ферменту проводилося шляхом хроматографії на ДЕАЕ-сефарозі, а потім шляхом зворотного висолювання у знижуючомуся градієнті сульфату амонію. Електрофоретичний аналіз фракцій проводили за методом Леммлі (Laemmli, 1970), концентрації білка визначали за методом Бредфорд (Bradford, 1976), а також по поглинанню у ультрафіолетовій частині спектру. Мутантні форми гена ПроРС*Ef* отримували за методом QuikChange фірми Stratagene.

Для експресії транскрипта тРНК<sup>Про</sup> *E. faecalis in vitro*, послідовності генів тРНК<sup>Про</sup>, цис-гідролітичного рибозима (Price et al., 1995) і послідовність Т7-промотора у вигляді шести пар дезоксиолігонуклеотидов були ліговані у вектор рUC18 по сайтам рестрикції BamHI і EcoRI. Коекспресія з рибозимом була необхідна для ефективної транскрипції гена тРНК полімеразою фага Т7 незважаючи на цитозин у 5'-кінцевому положенні. Плазмідну ДНК виділяли за методом Бірнбойма (Birnboim, Doly, 1979). Термінація транскрипції забезпечувалася попереднім розрізанням ДНК-матриці по рестриктному сайту BstNI. Транскрипцію проводили у присутності 4 мМ кожного з нуклеотид-трифосфатів, а також допоміжних з'єднань. Очищення отриманої тРНК від відщепленого рибозима проводили з використанням ВЕРХ на колонці ProSwift Monolith WAX-1S (ДЕАЕ-поліметакрилат) фірми Dionex.

Гібридна структура гена тРНК<sup>ПроАла</sup>*Ef*, що містить одонуклеотидні заміни C1G, C70U і G72C, необхідні для введення у її послідовність елементів впізнавання

АлаРС, і послідовність T7-промотора у вигляді однієї пари частково комплементарних дезоксирибонуклеотидов була добувана до повністю дволанцюгової структури за допомогою ДНК-полімерази Pfu і лігвана у вектор pCR2.1 за допомогою набору для лігування ПЛР-продуктів фірми CloneJet Thermo Scientific. Отримана конструкція була напрацьована у культурі клітин *E. coli* DH5 $\alpha$ , виділена і розрізана по сайтам рестрикції BamHI і EcoRI. Фрагмент ДНК, що містив T7-промотор і ген тРНК<sup>ПроАла</sup>*Ef*, був очищений на агарозному гелі і лігований у вектор pUC18. Транскрипцію і очищення тРНК<sup>Про</sup> *E. faecalis* дикого типу проводили аналогічно. <sup>14</sup>C-аланіл тРНК<sup>ПроАла</sup> отримували за допомогою АлаРС *Thermus thermophilus* і очищували шляхом екстракції сумішшю фенолу і хлороформу, а потім переосадженням етанолом. Ефективність реакції контролювали на рідинному сцинтиляційному лічильнику.

Геноінженерна конструкція для експресії тРНК<sup>Про</sup> *Rhodospseudomonas palustris* (ізоакцепторна форма CGG) *in vivo* люб'язно надана Thibaut Crepin і Stephen Cusack, Гренобльське відділення ЄМБЛ, Франція. Клітини штаму JM101 нарощували протягом 17 годин у 4 л живильного середовища 2xTY. РНК екстрагували фенолом, переосаджували і очищували шляхом іонообмінної хроматографії на сорбенті Toyopearl 650M фірми Toyosoda. тРНК<sup>Про</sup> очищували з отриманої суміші шляхом звернено-фазової ВЕРХ на колонці Vydac C4 фірми Fisher Scientific.

Заміна А76 тРНК на 2'd-А76 і 2'F-А76 включала послідовне відщеплення ССА-кінця за допомогою фосфодіестерази отрути змії *Crotalus adamanteus* і добудову СС\*А кінця з відповідним похідним аденіну за допомогою термінальної тРНК-нуклеотидилтрансферази *Bacillus stearothermophilus*. тРНК без ССА-3' очищували шляхом ВЕРХ на колонці ProSwift Monolith WAX-1S (DEAE-поліметакрилат) фірми Dionex. Добудовану модифіковану тРНК наносили на 8% ПААГ у присутності 7 М сечовини і екстрагували з гелю після розгону.

Тест на аміноацилювання тРНК проводився наступним чином. Реакційна суміш включала 50 нМ ПроРС*Ef* і 1 мкМ тРНК<sup>Про</sup>. Радіоактивно мічений пролін у присутності АТФ включався у проліл-тРНК<sup>Про</sup>, реакцію проводили при 37°C, як і всі описані нижче реакції. Проліл-тРНК<sup>Про</sup> осаджували з аліквот у 10% ТХО, промивали 5% ТХО на скловолоконних фільтрах і детектували на сцинтиляційному лічильнику.

Препарати радіоактивно міченої аланіл-тРНК<sup>ПроАла</sup> отримували за допомогою 0,6 мкМ АлаРС *T. thermophilus*, шляхом аміноацилювання 15 мкМ тРНК<sup>ПроАла</sup> у присутності АТФ радіоактивно міченим аланином. Продукт послідовно очищували фенольною і хлороформною екстракцією, а потім переосадженням.

Аналіз посттрансферної редагувальної активності ПроРС*Ef* шляхом детекції гідролізу аланіл-тРНК<sup>ПроАла</sup> проводили у присутності 60 нМ ПроРС і 3,5 - 4,5 мкМ радіоактивно міченої <sup>14</sup>C-аланіл-тРНК<sup>ПроАла</sup>. Аліквоти наносили на скловолоконні фільтри, просочені 10% ТХО, промивали 5% ТХО, радіоактивність детектували на сцинтиляційному лічильнику.

Аналіз редагуючої активності ПроРС*Ef* по гідролізу АТФ проводили у присутності 2 мкМ ПроРС, 15 мкМ тРНК<sup>Про</sup> (або без неї) і 1 мМ радіоактивно міченої АТФ. Аденозин-фосфати і аміноацил-аденілат розділяли шляхом тонкошарової хроматографії на ПЕІ-целюлозі. Радіоактивність отриманих плям аналізували за допомогою сцинтиляційного лічильника або фосфоіміджера.

Для аналізу гідролізу аланіл-аденілату попередньо інкубували суміш, яка містила амінокислоту і радіоактивно мічену АТФ протягом 10 хв з ПроРСЕf або її мутантною формою для накопичення аланіл-аденілату. Потім відбирали аліквоти, розділяли і аналізували речовини як і в разі аналізу редагування по гідролізу АТФ.

Для вивчення неферментативного гідролізу аланіл-АМФ до реакційної суміші після 10 хв інкубації додавали 10 мМ проліл-сульфаміоіладенілат для конкурентного витіснення аланіл-АМФ з активних центрів ПроРСЕf. Розділення і аналіз речовин проводили аналогічним чином.

### Результати досліджень і їх обговорення

**Клонування і експресія тРНК<sup>Pro</sup> і гібридної тРНК<sup>ProAla</sup> *Enterococcus faecalis*.** Для отримання тРНК<sup>Pro</sup>*Ef* була створена геноінженерна конструкція, призначена для її експресії *in vitro*. Для цього в вектор pUC18 в складі шести олігонуклеотидів були лігвані послідовності гена тРНК<sup>Pro</sup>*Ef*, цис-гідролітичного рибозима вірусу круглої плямистості тютюну (tobacco ringspot virus) і промотора, який впізнається РНК-полімеразою фага Т7. Введення послідовності сайту рестрикції BstNI (CCWGG) дозволило забезпечити термінацію транскрипції шляхом попередньої лінеаризації матриці. Наявність послідовності рибозима дозволила забезпечити ефективність транскрипції полімеразою фага Т7, незважаючи на наявність цитозину у 5'-положенні послідовності тРНК. Розділення тРНК і рибозима проводилося з використанням ВЕРХ на колонці ProSwift Моноліт WAX-1S (ДЕАЕ-поліметакрилат) фірми Dionex.

Паралельно була проведена експресія тРНК<sup>Pro</sup> *Rhodopseudomonas palustris*, ізоакцептора CGG, (тРНК<sup>Pro</sup>*Rp*) *in vivo* за допомогою геноінженерної конструкції, люб'язно наданої Thibaut Crepin і Stephen Cusack, Гренобльське відділення ЄМБЛ, Франція. тРНК з біомаси клітин екстрагували фенолом і очищували за допомогою двох хроматографічних стадій. Здатність тРНК, отриманих *in vivo* і *in vitro* до впізнавання ПроРСЕf була оцінена по початковим швидкостям їх деацилування і виявилася практично однаковою (рис. 1). Це дозволило в подальших експериментах використовувати тРНК<sup>Pro</sup>*Rp*, що може бути синтезована *in vivo* при мінімальних витратах.

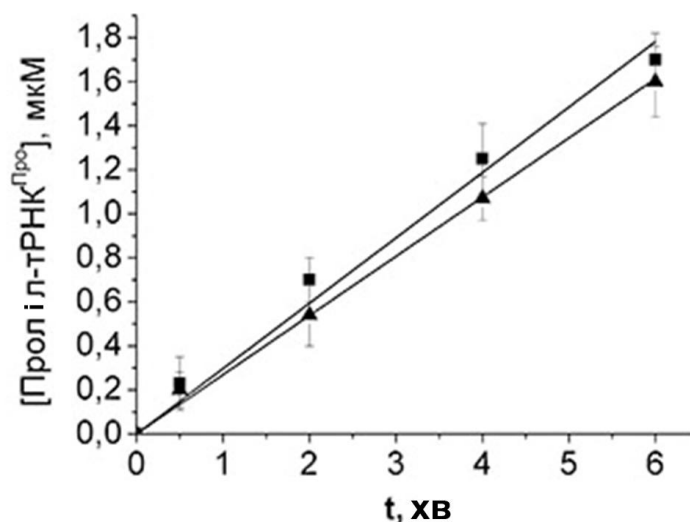


Рис. 1. Аміноацилювання проліном транскрипта тРНК<sup>Pro</sup>*Ef* (▲) і тРНК<sup>Pro</sup>*Rp* (■)





як наслідок і претрансферного, і посттрансферного редагування) підвищувався в декілька разів при додаванні тРНК<sup>Pro</sup> до концентрації 15 мкМ (табл. 1).

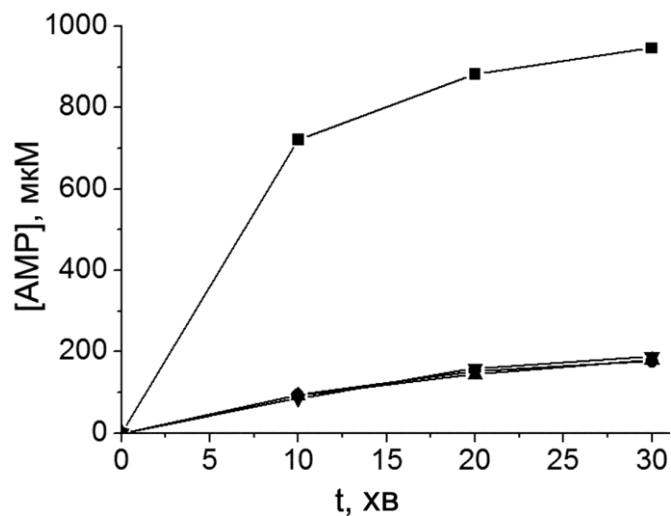
Таблиця 1

**Спостерігаємі константи швидкості накопичення АМФ під час редагування  
ПроРСЕf проти аланіна  
Концентрація ПроРС 2 мкМ, тРНК – 15 мкМ**

$k_{obs}, c^{-1}$			
Сумарне редагування (Д.т. ПроРС+ тРНК <sup>Pro</sup> )	тРНК-залежне претрансферне редагування (ПроРС K279A + тРНК <sup>Pro</sup> )	тРНК-незалежне претрансферне редагування (Д.т. ПроРС без тРНК)	Неферментативний гідроліз аланіл-аденілата
0,433±0,065	0,131±0,014	0,039±0,013	$(7,8±1,7) \times 10^{-4}$

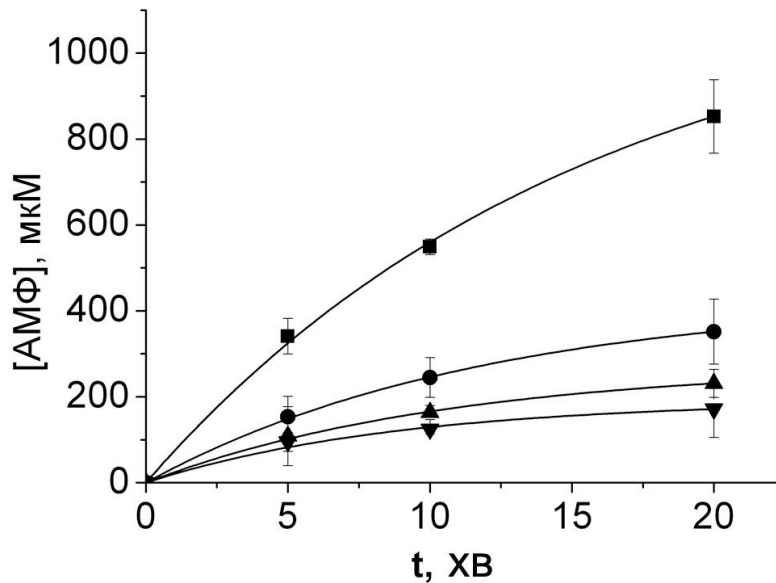
Нами було використано мутантну форму ферменту з амінокислотною заміною K279A у домені, відповідальному за посттрансферне редагування, що практично повністю позбавлена посттрансферної редагувальної активності, це дозволило експериментально розділити претрансферне і посттрансферне редагування. Таким чином, нами вперше було продемонстровано тРНК-залежне претрансферне редагування у ПроРС.

З метою перевірки участі гідроксильних груп рибози A76 тРНК<sup>Pro</sup> в індукції редагування, нами було отримано 2'- і 3'-dA76 похідні тРНК<sup>Pro</sup>Rp. Обидва похідних характеризувалися багаторазово зниженою здатністю до прискорення гідролізу АТФ у відповідному тесті (рис. 3).



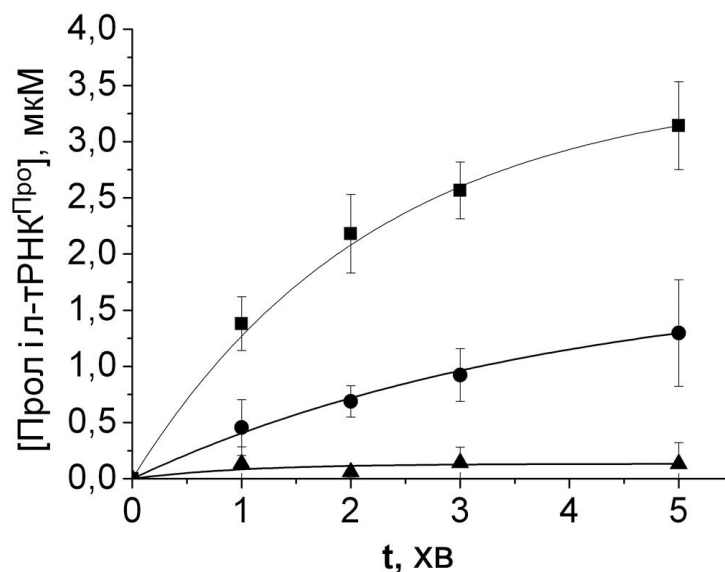
**Рис. 3. Накопичення АМФ внаслідок активації аланіна і редагування продуктів у присутності 2 мкМ ПроРСЕf і тРНК<sup>Pro</sup>Rp дикого типу (■), у присутності її 2'- (▼) і 3'-A76 (▲) похідних, а також за відсутності тРНК (●)**

2'-Гідроксильна група, на відміну від 3'-гідроксильної групи, не бере прямої участі у аміноацилюванні, тому існує можливість порівняння впливу 2'-дезоксифікації цієї групи на швидкості аміноацилювання та претрансферного редагування. Вплив на швидкість редагування виявився суттєво більшим (рис. 4).



**Рис. 4.** Накопичення АМФ у присутності 0,5 мкМ ПроРСЕf і тРНК<sup>Про</sup>Rρ (■), 20 мкМ ПроРСЕf і 2'-d A76 тРНК<sup>Про</sup>Rρ (●), 20 мкМ ПроРСЕf і тРНК<sup>Про</sup>Rρ без 74-ССА-76 (▲), 20 мкМ ПроРСЕf без тРНК (▼).

Незважаючи на різницю концентрацій фермента у 40 разів, швидкість процесів редагування у присутності дикого типу тРНК<sup>Про</sup>Rρ залишається значно більшою, ніж у присутності 2'-d A76 тРНК<sup>Про</sup>Rρ (рис. 4). В той самий час, різниця швидкостей аміноацилювання тРНК<sup>Про</sup>Rρ і 2'-d A76 тРНК<sup>Про</sup>Rρ виявляється схожою при рівних концентраціях фермента (рис. 5).



**Рис. 5.** Аміноацилювання тРНК<sup>Про</sup>Rρ (■) і 2'-d A76 тРНК<sup>Про</sup>Rρ (●) проліном 3 нМ ПроРСЕf, контрольний експеримент без ПроРС (▲)

За відсутності тРНК у реакційній суміші спостерігається накопичення аланіл-аденілата через його вивільнення з аміноацилюючого активного центру фермента (рис. 6). Після вичерпання АТФ для синтезу аланіл-аденілата починається його

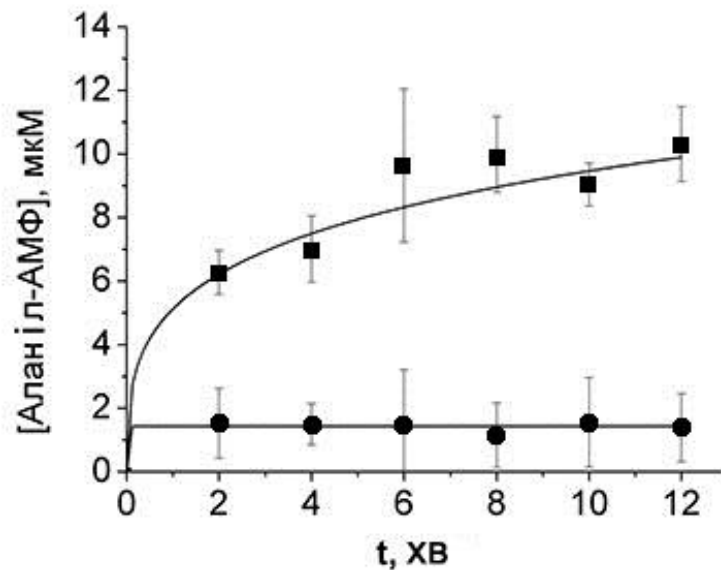


Рис. 6. Селективне вивільнення аланіл-АМФ з активного центра ПроРСЕf. Дикий тип ПроРС без тРНК (■) і у присутності нативної тРНК<sup>Pro</sup>Rp (●)

вторинне зв'язування і гідроліз. При додаванні тРНК<sup>Pro</sup> у суміш цей процес значно прискорюється (рис. 7), що підкреслює вплив тРНК саме на швидкість процесів, пов'язаних з гідролізом продукту, а не з його синтезом.

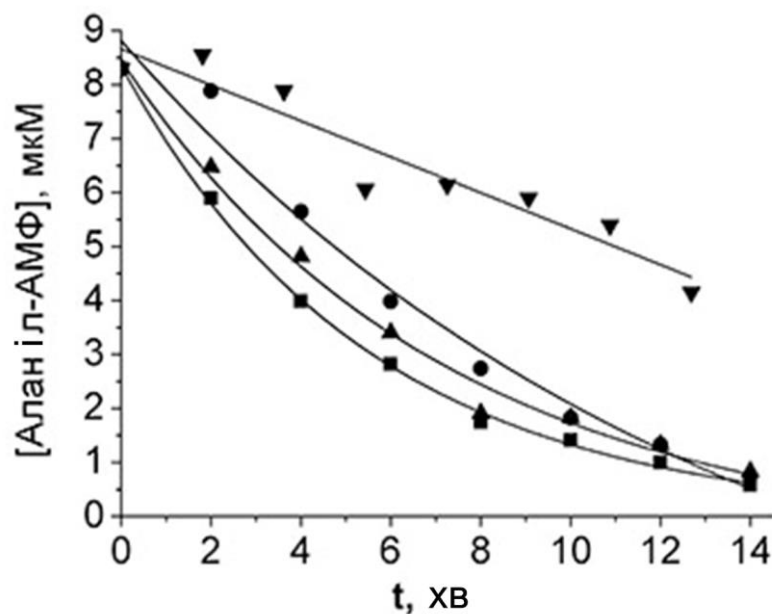
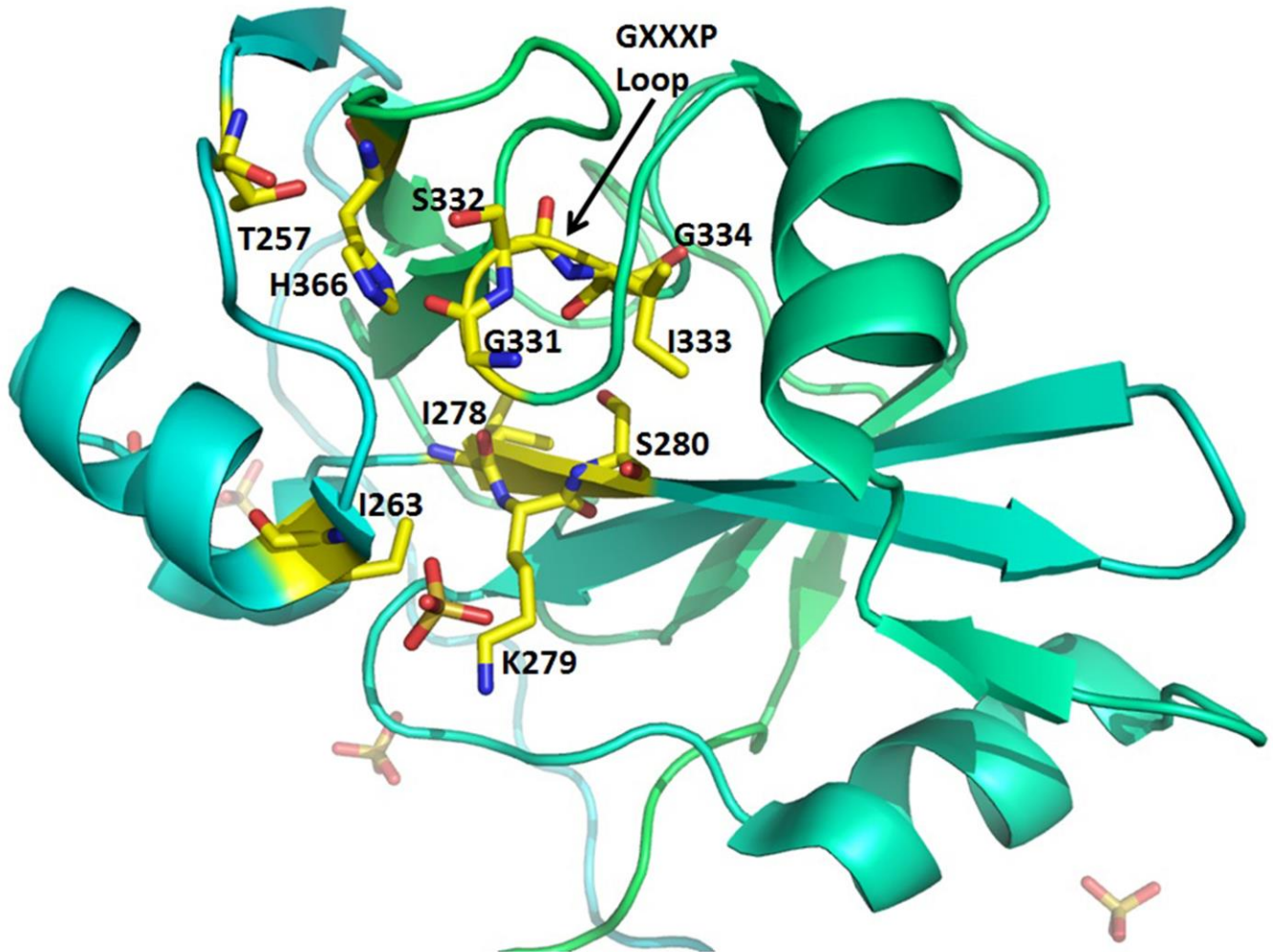


Рис. 7. Гідроліз аланіл-АМФ ПроРСЕf. Д.т. ПроРС у присутності тРНК<sup>Pro</sup>Rp (■), ПроРС K279A у присутності тРНК<sup>Pro</sup>Rp (●), ПроРС H366A у присутності тРНК<sup>Pro</sup>Rp (▲), д.т. ПроРС без тРНК (▼)

*Вивчення редагуючого активного центру ПроPCEf методом сайт спрямованого мутагенезу.* Позиції для сайт-спрямованого мутагенезу були обрані виходячи з низки різних критеріїв. Виходячи зі структурних даних і комп'ютерного моделювання, становили інтерес амінокислотні залишки G331 і S332, як складові передбаченого активного центра редагуючого домену (Crepin et al., 2006) (рис. 8).



**Рис. 8.** Редагуючий домен ПроPCEf. Позначені номери амінокислотних залишків, що були замінені на аланін

T257, K279 і H366 гомологічні амінокислотним залишкам ПроPCEс, які продемонстрували своє значення для посттрансферного редагування під час досліджень, проведених на цьому ферменті (Wong et al., 2002). Нарешті, I263, I278, S280, I333 і G334 просторово зближені з передбаченим активним центром, а E218 знаходиться у районі з'єднання редагуючого домену з синтетичним доменом ферменту.

Експресуючі вектори з мутантними послідовностями гена ПроPCEf були отримані шляхом сайт-спрямованого мутагенезу за методом QuikChange™ (Stratagen). Наявність нуклеотидних замін, які ведуть до зміни значення кодон-мішені на кодон аланіна, було підтверджено шляхом секвенування. Мутантні білки

були експресовані у клітинах кишкової палички штаму BL21 (DE3) Star і виділені з використанням хроматографічних процедур.

Химерну тРНК<sup>ПроАла</sup> аміноацилювали радіоактивно-міченим аланіном у присутності АлаРС *T. thermophilus*. Активність мутантних форм проліл-тРНК оцінювали за швидкістю гідролізу міченої аланіл-тРНК<sup>ПроАла</sup>. Дані по початковій швидкості реакції деацилювання показали, що з одинадцяти внесених мутацій найбільший вплив на посттрансферну редагуювальну активність має заміна K279A, що призводить до зниження активності приблизно у 2000 разів. Мутантні форми ПроРСЕf I333A, I278A, G331A і H366A показали падіння посттрансферної редагуювальної активності, відповідно, у 55, 13, 7 і 4 рази у порівнянні з диким типом ферменту (табл. 2).

**Вивчення ролі тРНК<sup>Про</sup> у посттрансферному редагуванні методом модифікації тРНК.** Для вивчення ролі 2'-ОН групи A76 тРНК<sup>Про</sup> у посттрансферному редагуванні нами були використані дві різні експериментальні моделі. В одній з них використовувалася гібридна тРНК<sup>ПроАла</sup> і її здатність бути аміноацильованою аланіном за допомогою АлаРС. У другій використовувалася властивість мутантної форми ПроРС H366A деацилювати проліл-тРНК<sup>Про</sup> шляхом посттрансферного редагування.

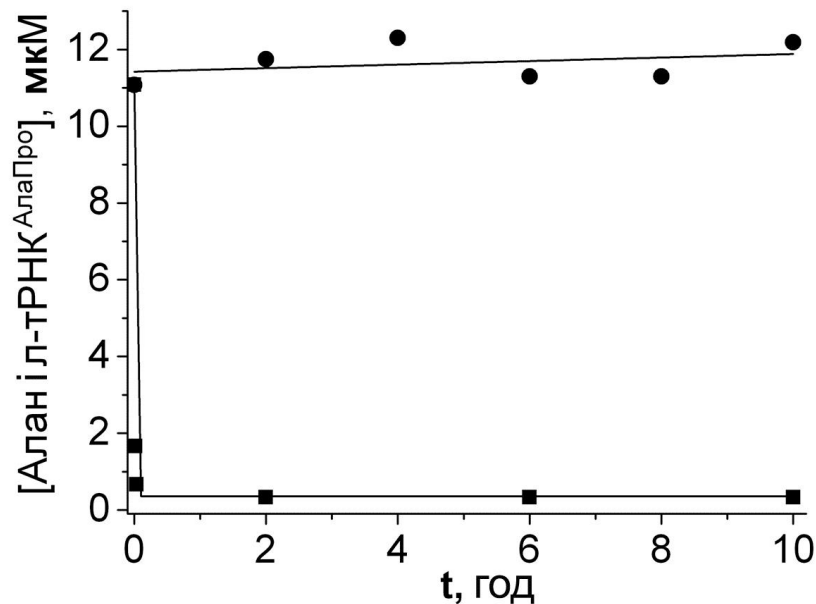
Таблиця 2

**Деацилювання аланіл-тРНК<sup>ПроАла</sup> ПроРСЕf дикого типу (ДТ) і її мутантними формами**

ПроРСЕf	ДТ	E218A	T257A	I263A	I278A	K279A
$k_{obs}, c^{-1}$	0,383± 0,047	0,249± 0,069	0,353± 0,069	0,157± 0,063	0,030± 0,005	1,909*10 <sup>-4</sup> ± 0,061*10 <sup>-4</sup>
% від ДТ	100±12	65±18	92±18	41±16	8±1	5*10 <sup>-4</sup> ±2*10 <sup>-3</sup>
Кратність зниження $k_{obs}$	1,0	1,5	1,1	2,4	12,8	2006,3

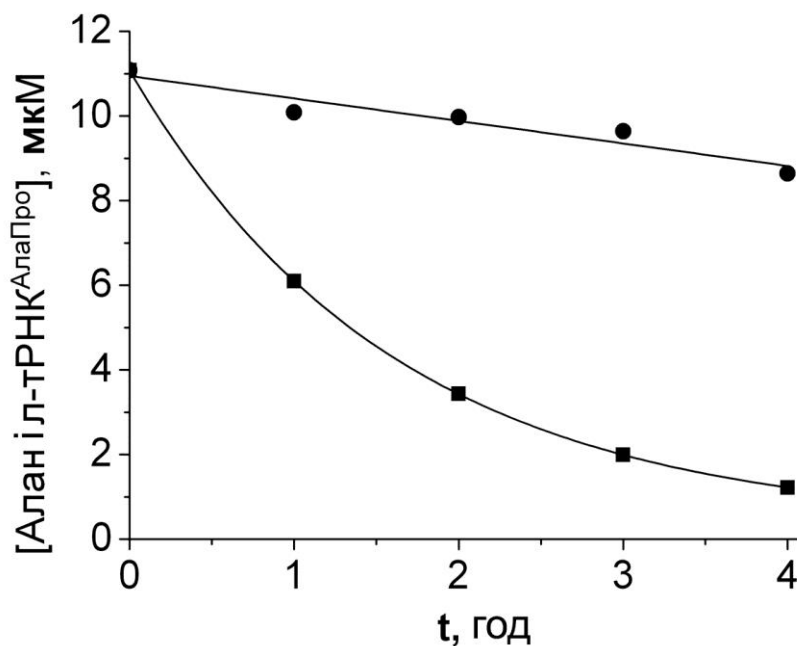
ПроРСЕf	S280A	G331A	S332A	I333A	G334A	H366A
$k_{obs}, c^{-1}$	0,188± 0,078	0,057± 0,028	0,364± 0,100	0,007± 0,005	0,172± 0,055	0,088± 0,039
% від ДТ	49±20	15±7	95±26	2±1	45±14	23±10
Кратність зниження $k_{obs}$	2,0	6,7	1,1	54,7	2,2	4,4

Аланіл-2'-dA76-тРНК<sup>ПроАла</sup> повністю втрачала здатність до деацилювання у присутності ПроРС (рис. 9). Більш того, вона виявлялася захищена ферментом від спонтанного гідролізу, про що свідчить збереження її концентрації у присутності близької до еквімолярної концентрації редагуючих активних центрів фермента на протязі десяти годин (рис. 9). Останній факт свідчить на користь ефективного зв'язування модифікованого субстрату з активним центром редагуючого домену.



**Рис. 9.** Деацилювання аланіл-тРНК<sup>ПроАла</sup> (■) і 2'-dA76 аланіл-тРНК<sup>ПроАла</sup> (●) у присутності 4,8 мкМ ПроPSEf у перебіг 10 годин

Отримані дані продемонстрували критичну роль 2'-ОН А76 в редагуванні аланіл-тРНК<sup>ПроАла</sup> ПроPSEf, проте залишили під сумнівом її каталітичну функцію, тому що не виявлялося можливим експериментально визначити кінетичні параметри реакції. Захист субстрату від неферментативного гідролізу може свідчити про втрату доступу до ефірного зв'язку води, без якої реакція неможлива навіть при збереженні усіх груп задіяних у каталізі. При цьому, швидкість неферментативного деацилювання за відсутності фермента також виявляється дещо зниженою (рис. 10).



**Рис. 10.** Неферментативне деацилювання аланіл-тРНК<sup>ПроАла</sup> (■) і 2'-dA76 аланіл-тРНК<sup>ПроАла</sup> (●) за відсутності фермента

У експериментах по деацилюванню проліл-2'-dA76 тРНК<sup>Про</sup> і проліл-2'-FA76 тРНК<sup>Про</sup> ПроРСЕf Н366А швидкість ферментативної реакції у обох випадках перевищувала швидкість неферментативної (рис. 11, 12). Таким чином, не спостерігалось захисту похідних аміноацил-тРНК від спонтанного гідролізу, і стало можливим провести кількісну оцінку кінетики гідролізу продуктів (табл. 3). Як видно з представлених результатів, швидкість гідролізу проліл-2'-d-A76 тРНК<sup>Про</sup> була приблизно у 600 разів менше швидкості гідролізу проліл-тРНК<sup>Про</sup>.

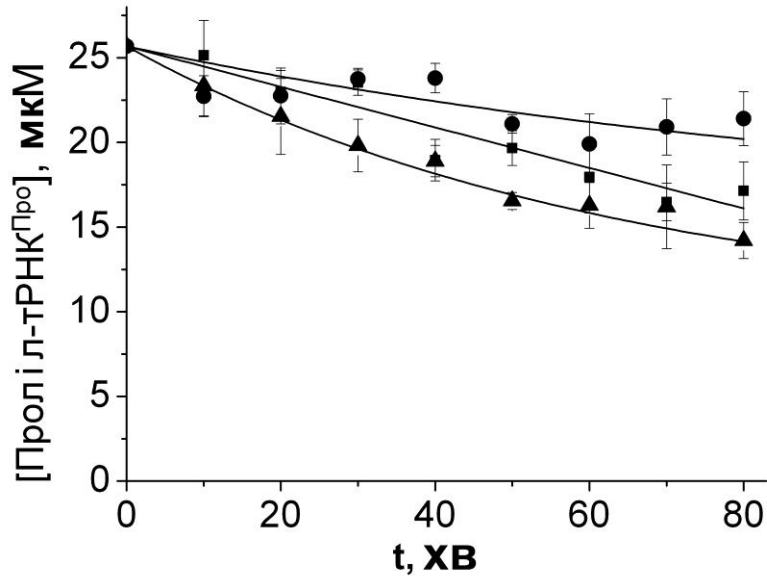


Рис. 11. Деацилювання дикого типу проліл-тРНК<sup>Про</sup> (▲) та її похідних 2'-FA76 проліл-тРНК<sup>Про</sup> (■) і 2'-dA76 проліл-тРНК<sup>Про</sup> (●) за відсутності фермента.

Швидкість гідролізу проліл-2'-FA76 тРНК<sup>Про</sup> виявилася зниженою у порівнянні з диким типом проліл-тРНК<sup>Про</sup> приблизно у 140 разів (табл. 3).

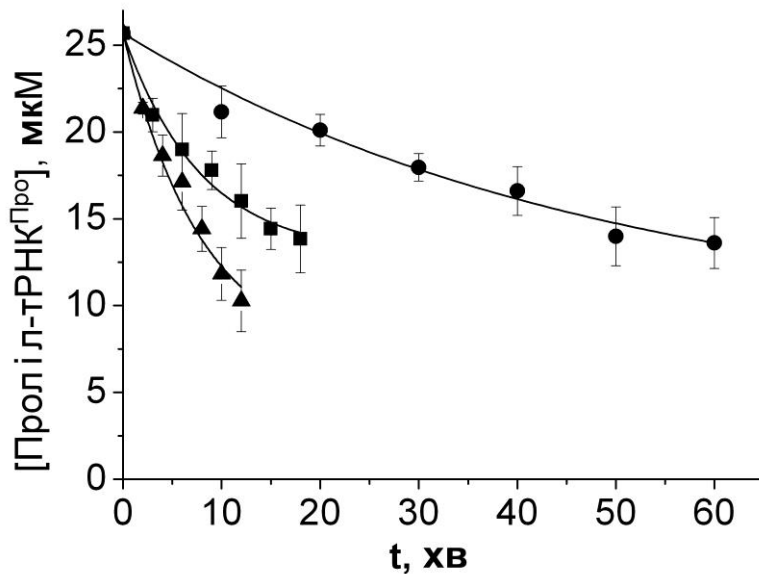


Рис. 12. Деацилювання дикого типу проліл-тРНК<sup>Про</sup> (▲) та її похідних 2'-FA76 проліл-тРНК<sup>Про</sup> (■) і 2'-dA76 проліл-тРНК<sup>Про</sup> (●) у присутності мутантної форми ПроРСЕf Н366А (δ)



**Деацилювання дикого типу проліл-тРНК<sup>Про</sup>  
і її похідних ПроРСЕf H366A**

		Дикий тип проліл-тРНК <sup>Про</sup>	2'-F A76	2'-d A76
Фермента- тивний гидроліз	$k_{obs},$ $s^{-1}$	$0,246 \pm 0.037$	$0,175 \cdot 10^{-2}$ $\pm 0,024 \cdot 10^{-2}$	$0,422 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,052 \cdot 10^{-3}$
	%	100,0	$7,1 \cdot 10^{-1}$	$1,7 \cdot 10^{-1}$
Нефермен- тативний гидроліз	$k_{obs},$ $s^{-1}$	$0,166 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,037 \cdot 10^{-3}$	$0,964 \cdot 10^{-4}$ $\pm 0,174 \cdot 10^{-4}$	$0,503 \cdot 10^{-4}$ $\pm 0,080 \cdot 10^{-4}$
	%	100,0	58,1	30,3

Незважаючи на свої полярні властивості, флюорогрупа у 2'-положенні виявилася нездатною імітувати функції гідроксилу. Найбільш очевидною відмінністю флюорогрупи є її нездатність бути донором водневого зв'язку (Nordin, Schimmel, 2003). Таким чином, можна припустити, що функція 2'-гідроксильної групи у посттрансферному редагуванні здійснюється за допомогою утворення нею водневого зв'язку з якоюсь негативно зарядженою групою і створення певної конформації субстрату, яка призводить до значного прискорення гідролізу ефірного зв'язку.

**Співставлення експериментальних даних з квантово-механічною моделлю механізму посттрансферного редагування аланіл-тРНК<sup>Про</sup> ПроРСЕf.** Щоб розширити можливості інтерпретації експериментальних даних, ми співставили їх з результатами комп'ютерного моделювання комплексу ПроРСЕf з аланіл-тРНК<sup>Про</sup>, зв'язаною у редагуючому активному центрі, представленими А.В. Раєвським, М.М. Ільченко та І.Я. Дубеєм у спільній публікації з автором цієї роботи. Моделювання включало молекулярний докінг, молекулярну динаміку і квантово-механічні розрахунки параметрів реакції деацилювання аланіл-тРНК<sup>Про</sup> (Boyarshin et al., 2016).

Дані докінгу і молекулярної динаміки підтвердили участь Ліз279 у зв'язуванні А76, С75 і С74 субстрату у редагуючому домені ПроРС. Залишок аланіну аланіл-тРНК<sup>Про</sup> зв'язаний у гідрофобній кишені редагуючого домену. Його фіксують взаємодії аміногрупи з основним ланцюгом Глі331. Зниження редагуючої активності ферменту при його заміні на аланін має бути пов'язано зі зміною конформаційної динаміки основного ланцюга.

Згідно квантово-механічної моделі, ключова роль 2'-гідроксильної групи рибози А76 тРНК<sup>Про</sup> у відщепленні залишку аланіну пов'язана з її участю у перерозподілі електричних зарядів у субстраті. Для досягнення цього 2'-гідроксильна група і амінокислотний залишок у 3'-положенні повертаються до прийняття конформації, у якій гідроксильна група здатна координуватися карбонільною групою амінокислотного залишку (рис. 13). Ця взаємодія підвищує

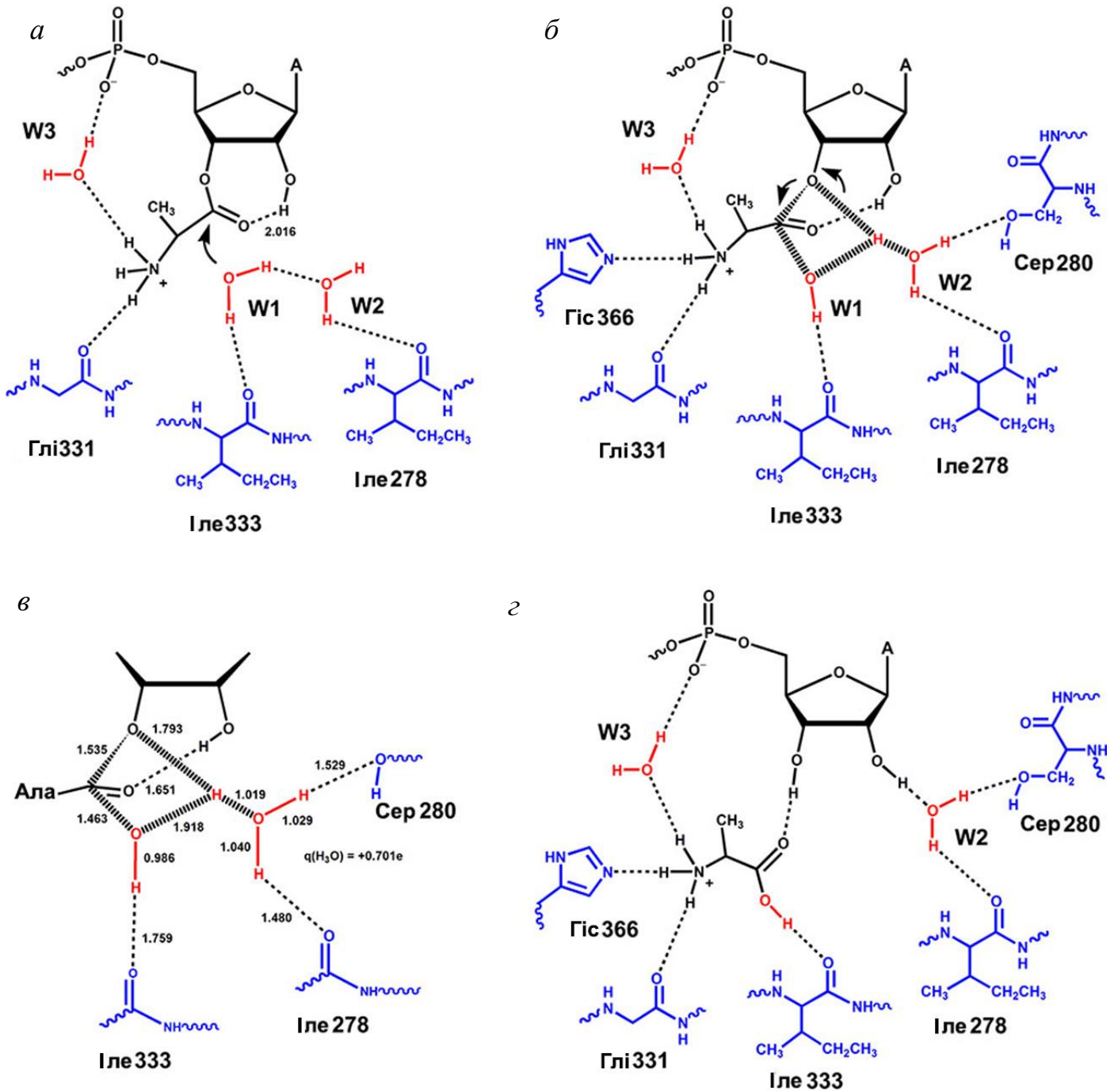


Рис. 13. Механізм посттрансферного редагування аланіл-тРНК<sup>Про</sup> ПроPSEf (Boyarshin et al., 2016). *а* - Предреакційний комплекс, стрілкою показано напрямок нуклеофільної атаки молекули води по карбонільному вуглецю залишку аланіну що гідролізується, пунктирними лініями - водневі зв'язки; *б* - перехідний стан, стрілки показують утворення і розрив хімічних зв'язків; *в* - параметри перехідного стану, числами показані довжини хімічних зв'язків,  $q(\text{H}_3\text{O})$  - повний заряд на іоні гідроксонію; *г* - продукти реакції

електрофільність вуглецю карбонільної групи і, таким чином, істотно сприяє нуклеофільній атаці молекули води (Boyarshin et al., 2016). Атакуюча молекула води координується основним ланцюгом Іле333. Перенесення протона з неї на 3'-О А76 що звільнюється здійснюється за допомогою іншої молекули води, скоординованої

основним ланцюгом Ile278 (Boyarshin et al., 2016). Розрахунки енергій активації реакції, проведені у рамках моделі для звичайного і модифікованих субстратів (табл. 4), добре узгоджуються з експериментальними даними, отриманими для цих субстратів (табл. 3).

Механізм субстрат-асистованого каталізу ферментативного деацилювання аміноацил-тРНК, що базується на утворенні водневого зв'язку між карбонільною групою відщеплюваного амінокислотного залишку і вільною гідроксильною групою рибози А76, різко відрізняється від інших подібних механізмів. Так, для ЛейРС *T. thermophilus* (Nagiwara et al., 2010), ФенРС *T. thermophilus* (Tworowski et al., 2015), D-тирозил деацилази *Plasmodium falciparum* (Ahmad et al., 2013) і ПроРС *E. faecalis* (Kumar et al., 2012) запропоновані механізми, у яких вільна гідроксильна група бере участь у активації атакуючої молекули води. При цьому, порівнюючи підхід зарубіжних авторів, що моделювали деацилювання аланіл-тРНК<sup>Про</sup> ПроРС *E. faecalis* (Kumar et al., 2012) з підходом наших співавторів, ми повинні віддати перевагу останнім, тому що саме вони користувалися для докінгу і молекулярної динаміки повнорозмірними структурою ферменту і моделлю субстрату (Boyarshin et al., 2016). Також вони вираховували параметри перехідного стану реакції деацилювання (Boyarshin et al., 2016), що не було зроблено їх попередниками (Kumar et al., 2012).

Таблиця 4

**Енергетичні параметри реакції гідроліза аланіл-тРНК<sup>Про</sup> для систем, що мають у положенні 76 аденозин, 2'-флюороаденозин або 2'-дезоксаденозин (Boyarshin et al., 2016)**

2'-замісник	Енергія активації, ккал/моль <sup>1.</sup>	
	E <sub>act</sub>	ΔE <sub>act</sub> <sup>2.</sup>
<b>ОН</b>	18.57	0
<b>Н</b>	31.06	12.49
<b>Ф</b>	25.73	7.16

Примітки: 1. Різниця між повними енергіями пре-реакційного комплексу і перехідного стану.

2. Різниця між енергіями активації аланіл-тРНК<sup>Про</sup> дикого типу і її відповідними похідними.

## ВИСНОВКИ

Охарактеризовані механізми претрансферного і посттрансферного редагування ПроРС*Ef* продуктів помилкового впізнавання аланіна. Участь 2'-ОН А76 тРНК<sup>Про</sup> забезпечує ефективність каталізу на обох стадіях редагування.

1) Клоновано ген тРНК<sup>Про</sup> *E. faecalis*, розроблена методика експресії і очищення транскрипта тРНК<sup>Про</sup>.

2) Створено гібридну тРНК<sup>ПроАла</sup> для аналізу посттрансферної редагуючої активності ПроРС, що здатна бути аміноацильованою АлаРС і деацильованою ПроРС шляхом посттрансферного редагування.

3) Вперше показано існування тРНК-залежного претрансферного редагування у АРС другого структурного класу. Показано провідну роль у цьому процесі гідроксильних груп А76 тРНК<sup>Pro</sup>. Встановлено специфічну роль 2'-гідроксильної групи А76 тРНК<sup>Pro</sup> у претрансферному редагуванні, що не зводиться до її можливої участі у зв'язуванні і позиціонуванні А76 тРНК<sup>Pro</sup> у аміноацилюючому активному центрі.

4) Показано каталітичну природу тРНК-залежного і тРНК-незалежного претрансферного редагування ПроРСЕf, а також часткове виборче вивільнення аланіл-АМФ за відсутності тРНК<sup>Pro</sup>.

5) Експериментально показано критичну роль амінокислотного залишку Ліз279 у посттрансферному редагуванні ПроРСЕf, який за результатами комп'ютерного моделювання зв'язує ССА-кінець аланіл-тРНК<sup>Pro</sup>. Серед бокових ланцюгів амінокислотних залишків редагуючого активного центру ПроРСЕf немає претендентів на пряму каталітичну функцію.

6) На двох різнорідних експериментальних моделях показано необхідність 2'-гідроксильної групи А76 тРНК<sup>Pro</sup> для посттрансферного редагування ПроРСЕf.

7) Експериментальні дані узгоджуються із запропонованою квантово-хімічною моделлю посттрансферного редагування ПроРСЕf, яка передбачає субстрат-асистований механізм каталізу. Таким чином, у основі формування передреакційного комплексу лежить утворення карбоксильною групою залишку аланіну, що гідролізується, водневого зв'язку з 2'-гідроксильною групою А76, що сприяє зниженню енергетичного порогу реакції гідролізу ангидридного зв'язку. Згідно цієї моделі, перенесення протона під час реакції відбувається через молекулу води шляхом її перетворення іон гідроксонію, що миттєво розпадається.

## ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. тРНК-зависимое редактирование ошибок пролил-тРНК синтетазой из бактерии *Enterococcus faecalis* / Бояршин К.С., Крикливый И.А., Тукало М.А. // Український біохімічний журнал.-2008.-Т.80, № 61.-С. 52-59. (Особистий внесок здобувача: проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

2. Предполагаемый активный центр редактирующего домена пролил-тРНК синтетазы бактерии *Enterococcus faecalis* / Бояршин К.С., Крикливый И.А., Раевский А.В., Химин А.А., Яремчук А.Д., Тукало М.А. // Biopolimers and Cell.-2009.-Vol. 25, N. 1.-P. 39-43. (Особистий внесок здобувача: сайт-спрямований мутагенез гену пролил-тРНК синтетази, виділення та очищення фермента та його мутантних форм, створення геноінженерної конструкції для синтезу гібридної тРНК<sup>ProAla</sup>, експресія та очистка тРНК<sup>ProAla</sup>, отримання <sup>14</sup>C-аланіл-тРНК<sup>ProAla</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

3. Клонирование, экспрессия и очистка тРНК<sup>Pro</sup> из бактерии *Enterococcus faecalis* / Бояршин К.С., Крикливый И.А., Яремчук А.Д., Тукало М.А. // Biopolimers and Cell.- 2009.- Vol. 25, N. 6.- P. 445-450. (Особистий внесок здобувача: створення геноінженерної конструкції для експресії тРНК<sup>Pro</sup> *Enterococcus faecalis*, експресія та очистка тРНК<sup>Pro</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

4. Роль тРНК<sup>Pro</sup> в претрансферном редактировании аланина пролил-тРНК синтетазой / Бояршин К.С., Присс А.Е., Крикливый И.А., Коваленко О.П., Яремчук

А.Д., Тукало М.А. // *Biopolymers and cell.*- 2013.- Vol. 29, N. 5.- P. 382-388. (Особистий внесок здобувача: отримання похідних тРНК<sup>Pro</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

5. A new mechanism of post-transfer editing by aminoacyl-tRNA synthetases: catalysis of hydrolytic reaction by bacterial-type prolyl-tRNA synthetase / Boyarshin K.S., Priss A.E., Rayevskiy A.V., Ilchenko M.M., Dubey I.Y., Kriklivyi I.A., Yaremchuk A.D., Tukalo M.A. // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.*- 2016.- DOI: 10.1080/07391102.2016.1155171. (Особистий внесок здобувача: отримання похідних <sup>14</sup>C-аланіл-тРНК<sup>ProAla</sup> і <sup>14</sup>C-проліл-тРНК<sup>Pro</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

6. Створення генних конструкцій та експресія *in vitro* і *in vivo* тРНК<sup>Pro</sup> із *Enterococcus faecalis* / Бояршин К.С., Крикливий І.А., Коваленко О.П., Яремчук Г.Д. // Матеріали ІХ Українського біохімічного з'їзду, Жовтень 2006, Харків. Сб. тезисов, с. 32. (Особистий внесок здобувача: створення геноінженерної конструкції для експресії тРНК<sup>Pro</sup> *Enterococcus faecalis*, експресія та очистка тРНК<sup>Pro</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

7. Study on the structural basis of the bacterial-type prolyl-tRNA synthetase from *Enterococcus faecalis* editing activity by the methods of site directed mutagenesis / Boyarshin K.S., Yaremchuk G.D., Tukalo M.A. // *Bridges in Life Sciences Annual Scientific Review Meeting, Zagreb, 2008, Oktober 4, Croatia, P. 80.* (Особистий внесок здобувача: сайт-спрямований мутагенез гену проліл-тРНК синтетази, виділення та очищення фермента та його мутантних форм, створення геноінженерної конструкції для синтезу гібридної тРНК<sup>ProAla</sup>, експресія та очистка тРНК<sup>ProAla</sup>, отримання <sup>14</sup>C-аланіл-тРНК<sup>ProAla</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

8. тРНК участвует в обеспечении специфичности синтеза пролил-аденилата пролил-тРНК синтетазой бактерии *Enterococcus faecalis* / Бояршин К.С., Крикливый И.А., Тукало М.А. // *Биология наука XXI века. 12-я международная пуцинская школа-конференция молодых ученых, Ноябрь 2008, Пушино. Сб. тезисов, с. 9.* (Особистий внесок здобувача: отримання похідних тРНК<sup>Pro</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

9. Изучение роли тРНК в претрансферном аминокислотном редактировании пролил-тРНК синтетазой бактерии *Enterococcus faecalis* / Бояршин К.С., Крикливый И.А., Яремчук А.Д., Тукало М.А. // *Фундаментальные и прикладные исследования в биологии. Материалы 1-й международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, февраль 2009, Донецк, тезисы, Т. 2, с. 98.* (Особистий внесок здобувача: отримання похідних тРНК<sup>Pro</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

10. Editing of errors by aminoacyl-tRNA synthetases in translation quality control / Tukalo M., Kovalenko O., Boyarshin K., Yaremchuk G., Kriklivyi I., Cusack S. // *V International Symposium Supramolecular Systems in Chemistry and Biology, 2009, Kyiv, Ukraine, May 12-16, P. 42.* (Особистий внесок здобувача: сайт-спрямований мутагенез гену проліл-тРНК синтетази, виділення та очищення фермента та його мутантних форм, створення геноінженерної конструкції для синтезу гібридної тРНК<sup>ProAla</sup>, експресія та очистка тРНК<sup>ProAla</sup>, отримання <sup>14</sup>C-аланіл-тРНК<sup>ProAla</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

11. Pretransfer and posttransfer editing activity of prokaryote-type prolyl-tRNA synthetase of bacteria *Enterococcus faecalis* / Boyarshin K., Kriklivyi I., Yaremchuk G., Tukalo M. // *VII Parnas conference on biochemistry and molecular biology. The*

Ukrainian biochemical journal. -2009. V. 81, N. 4, P. 159. (Особистий внесок здобувача: сайт-спрямований мутагенез гену проліл-тРНК синтетази, виділення та очищення фермента та його мутантних форм, створення геноінженерної конструкції для синтезу гібридної тРНК<sup>ПроАла</sup>, експресія та очистка тРНК<sup>ПроАла</sup>, отримання <sup>14</sup>С-аланіл-тРНК<sup>ПроАла</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

12. tRNA-dependent editing of errors by aminoacyl-tRNA synthetases / Yaremchuk G., Kovalenko O., Boyarshin K., Kriklyvi I., Cusack S., Tukalo M. // VII Parnas conference on biochemistry and molecular biology. The Ukrainian biochemical journal, 2009, V. 81, N 4, P. 176. (Особистий внесок здобувача: сайт-спрямований мутагенез гену проліл-тРНК синтетази, виділення та очищення фермента та його мутантних форм, створення геноінженерної конструкції для синтезу гібридної тРНК<sup>ПроАла</sup>, експресія та очистка тРНК<sup>ПроАла</sup>, отримання <sup>14</sup>С-аланіл-тРНК<sup>ПроАла</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

13. Structural basis of amino acid specificity maintenance by *Enterococcus faecalis* prolyl-tRNA synthetase / Boyarshin K., Kriklyvi I., Yaremchuk G., Tukalo M. // Biopolymers and Cell. -2010. -V.26, № 5., -P.416. Materials of the 4th Conference of IMBG Young Scientists, 18-19 May 2010. (Особистий внесок здобувача: сайт-спрямований мутагенез гену проліл-тРНК синтетази, виділення та очищення фермента та його мутантних форм, створення геноінженерної конструкції для синтезу гібридної тРНК<sup>ПроАла</sup>, експресія та очистка тРНК<sup>ПроАла</sup>, отримання <sup>14</sup>С-аланіл-тРНК<sup>ПроАла</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

14. tRNA-assisted editing by *Enterococcus faecalis* Prolyl-tRNA synthetase / Boyarshin K., Kriklyvi I., Yaremchuk G., Tukalo M. // Biopolymers and Cell. -2011. - V.27, № 4., -P.314-315. Materials of the 5th Conference of IMBG Young Scientists, 24-25 May 2011. (Особистий внесок здобувача: отримання похідних тРНК<sup>Про</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

15. Роль 2'-ОН групи 3'-кінцевого аденозину тРНК<sup>Про</sup> у реакціях аміноацилювання та претрансферного редагування проліл-тРНК синтетазою еубактерії *Enterococcus faecalis* / Прісс А.Є., Мазур П.С., Бояршин К.С. // Біологія: від молекули до біосфери. Матеріали VI Міжнародної конференції молодих науковців, Харків, 22-25 листопада 2011, стр. 112-113. (Особистий внесок здобувача: отримання похідних тРНК<sup>Про</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

16. tRNA ensures amino acid specificity of enterococcal prolyl-tRNA synthetase on the two steps of editing / Boyarshyn K., Priss A., Rayevskiy A., Kriklyvi I., Kovalenko O., Il'chenko N., Dubey I., Yaremchuk A., Tukalo M. // 13th Young Scientists' Forum, 3-6 July 2013, Saint Petersburg, P. 43. (Особистий внесок здобувача: отримання похідних <sup>14</sup>С-аланіл-тРНК<sup>ПроАла</sup> і <sup>14</sup>С-проліл-тРНК<sup>Про</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

17. тРНК обеспечивает точность синтеза пролил-тРНК<sup>Про</sup> на двух этапах редактирования продукта / Бояршин К.С., Присс А.Е., Раевский А.В., Крикливый И.А., Коваленко О.П., Ильченко Н.Н., Дубей И.Я., Яремчук А.Д., Тукало М.А. // Ukrainian biochemical journal, 2014, Vol.86, № 5, Sup.1, P. 16-17. XI Український біохімічний конгрес, 06-10 жовтня 2014 р. м. Київ. (Особистий внесок здобувача: отримання похідних <sup>14</sup>С-аланіл-тРНК<sup>ПроАла</sup> і <sup>14</sup>С-проліл-тРНК<sup>Про</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

18. Редактирование пролил-тРНК синтетазой бактериального типа продуктов ошибочного узнавания аланина / Бояршин К.С., Присс А.Е., Раевский А.В.,

Крикливый И.А., Коваленко О.П., Ильченко Н.Н., Дубей И.Я., Яремчук А.Д., Тукало М.А. // 19-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века», 20–24 апреля 2015 года, Пушино. Сб. тезисов, с.220. (Особистий внесок здобувача: отримання похідних  $^{14}\text{C}$ -аланіл-тРНК<sup>ПроАла</sup> і  $^{14}\text{C}$ -проліл-тРНК<sup>Про</sup>, проведення кінетичних експериментів, аналіз отриманих результатів).

### АНОТАЦІЯ

**Бояршин К.С. Структурно-функціональні основи редагуючої активності проліл-тРНК синтетази з *Enterococcus faecalis*. — Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2016.

Дисертація присвячена механізмам редагування проліл-тРНК синтетазою прокариотичного типу продуктів помилкового впізнавання аланіну – аланіл-аденилата і аланіл-тРНК<sup>Про</sup>. Вперше показано тРНК-залежність швидкості гідролізу аланіл-аденилата ПроРС, що зветься претрансферним редагуванням. Встановлено необхідність 2'- і 3'-гідроксильних груп А76 тРНК<sup>Про</sup> для прискорення гідролізу аланіл-аденилата. Визначено амінокислотні залишки, що забезпечують ефективність гідролізу аланіл-тРНК<sup>Про</sup>, що зветься посттрансферним редагуванням. Визначено ключову роль 2'-гідроксильної групи А76 аланіл-тРНК<sup>Про</sup> в її деацильованні. Співставлення отриманих експериментальних даних з результатами комп'ютерного моделювання дозволило підтвердити квантово-механічну модель субстрат-асистованого каталітичного гідролізу аланіл-тРНК<sup>Про</sup>.

Співставлення каталітичного механізму гідролізу аланіл-тРНК<sup>Про</sup> ПроРС бактеріального типу з іншими запропонованими механізмами ферментативного каталізу деацильовання аміноацил-тРНК дозволило підкреслити його оригінальність і функціональну важливість внутрішньомолекулярних взаємодій у субстраті.

**Ключові слова:** аміноацил-тРНК синтетази, тРНК, біосинтез білка, редагування, ферментативний каталіз

### АННОТАЦИЯ

**Бояршин К.С. Структурно-функциональные основы редактирующей активности пролил-тРНК синтетазы из *Enterococcus faecalis*. — Рукопись.**

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 – молекулярная биология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена механизмам редактирования пролил-тРНК синтетазой прокариотического типа продуктов ошибочного узнавания аланина – аланил-аденилата и аланил-тРНК<sup>Про</sup>. Впервые показана тРНК-зависимость скорости гидролиза аланил-аденилата ПроРС, называемого претрансферным редактированием. Установлена необходимость 2'- и 3'-гидроксильных групп А76 тРНК<sup>Про</sup> для ускорения гидролиза аланил-аденилата. Определены аминокислотные остатки, обеспечивающие эффективность гидролиза аланил-тРНК<sup>Про</sup>, называемого посттрансферным редактированием. Выявлена ключевая роль 2'-гидроксильной группы А76 аланил-тРНК<sup>Про</sup> в её деацилировании. Сопоставление полученных

экспериментальных данных с результатами компьютерного моделирования позволило подтвердить квантово-механическую модель субстрат-ассистированного каталитического гидролиза аланил-тРНК<sup>Pro</sup>.

Сопоставление каталитического механизма гидролиза аланил-тРНК<sup>Pro</sup> ПроРС бактериального типа с другими предложенными механизмами ферментативного катализа деацилирования аминоксил-тРНК позволило подчеркнуть его оригинальность и функциональную важность внутримолекулярных взаимодействий в субстрате.

**Ключевые слова:** аминоксил-тРНК синтетазы, тРНК, биосинтез белка, редактирование, ферментативный катализ

## SUMMARY

**Boyarshin K.S. Structural and functional basis of the editing activity of prolyl-tRNA synthetase from *Enterococcus faecalis*. – Manuscript.**

A dissertation submitted to acquire the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.03 – molecular biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 2016.

The thesis is devoted to the editing mechanisms of prokaryotic type prolyl-tRNA synthetase. This enzyme performs editing of products that were generated in consequence of mistake recognition of alanine. Hydrolysis of alanyl-adenylate is known as pretransfer editing, hydrolysis of alanyl-tRNA<sup>Pro</sup> is named posttransfer editing. Pretransfer editing is localized in the core domain of ARS in the synthetic active center. Posttransfer editing occurs in the special editing active center of the distinct editing domain. It is believed that delivery of the amino acid residue that should undergo editing into the editing active center accomplishes by bending of the single stranded acceptor end of tRNA.

This time, the *Enterococcus faecalis* ProRS tertiary structure is already solved crystallographically. Also some computer models of the complexed ProRS and alanyl-tRNA<sup>Pro</sup> in the editing conformation were elaborated.

At the first time in the class two ARS, tRNA-dependence of the rate of alanyl-adenylate hydrolysis was shown. The necessity of 2'- and 3'-hydroxyl groups of A76 tRNA<sup>Pro</sup> to accelerate the hydrolysis of alanyl-adenylate was found. 2'-d A76 modification influence on the velocity of pretransfer editing processes is much more distinctive than the influence on aminoacylation velocity. In the absence of tRNA alanyl-adenylate accumulation in the reaction mixture takes its place. This process achieves equilibrium due to alanyl-adenylate rebinding to ProRS and its hydrolysis.

Side directed mutagenesis of the editing domain amino acid residues allowed to analyze functional consequences of a set of single substitutions to alanine. To test the posttransfer editing activities of the ProRS mutant forms, special tRNA<sup>ProAla</sup> was prepared. It can be aminoacylated with alanine by alanyl-tRNA synthetase and then deacylated by ProRS by posttransfer editing pathway. In this way, amino acid residues that ensure the efficiency of alanyl-tRNA<sup>Pro</sup> hydrolysis were identified. Their functional roles were discussed in the light of the published computer models of the ProRS complexed with alanyl-tRNA<sup>Pro</sup> in posttransfer editing conformation. The lysine 279 side chain binds substrate 3'-terminal CCA in the special bended conformation. Fixation of the alanine moiety aminogroup is ensured by glycine 331 carbonil and histidine 366 side chain.



Isoleucine 333 and 278 moieties coordinate two water molecules in proximity to the bond to be hydrolyzed by their main chain carboxyles.

The key role of the 2'-hydroxyl group of alanyl-tRNA<sup>Pro</sup> A76 in the deacylation reaction was discovered. To assay influence of chemical modifications in 2' position of A76 ribose two experimental models were established. First of them was based on mutant tRNA<sup>ProAla</sup>, which derives from tRNA<sup>Pro</sup> and carries three nucleotide substitutions, that provide identity elements for enzymatic aminoacylation with alanine. Alanyl-tRNA<sup>ProAla</sup>, carrying 2'-d A76 modification was principally incapable to participate in posttransfer editing, and moreover, was substantially protected by enzyme from spontaneous hydrolysis. This result specifically confirmed efficient binding of modified substrate by ProRS. The second experimental model was based on mutant H366A ProRS capability to deacylate prolyl-tRNA<sup>Pro</sup> due to posttransfer editing specificity loss. In this model 2'-d and 2'-F A76 prolyl-tRNA<sup>Pro</sup> modifications did not entail neither the complete block of enzymatic hydrolysis nor substrate protection from unenzymatic decay. However posttransfer editing velocities of both modified substrates were severely impaired. Results obtained correlate well with published results of quantum mechanical calculations, that allowed to evaluate activation energies for enzymatic deacylation of alanyl-tRNA<sup>Pro</sup> with such modifications.

Comparison of experimental data with results of computer simulations allowed to confirm the quantum-mechanical model of alanyl-tRNA<sup>Pro</sup> substrate-assisted catalytic hydrolysis. According to this model the intramolecular hydrogen bonding in the substrate between alanine moiety carbonyl oxygen and A76 2'-hydroxyl group promotes increasing of the partial positive electric charge on the carbonyl carbon and so facilitates water molecule nucleophilic attack. The water molecule coordinated by isoleucine 333 participates in reaction. Other water molecule coordinated by isoleucine 278 participates in the proton transfer from the attacking water to ribose 3'-O.

**Key words:** aminoacyl-tRNA synthetases, tRNA, protein biosynthesis, editing, enzyme catalysis