

**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

**ДИСЕРТАЦІЯ**

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

03.00.03 – молекулярна біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

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

\_\_\_\_\_ М. Ю. Рибак

Науковий керівник: **Тукало Михайло Арсентійович**, доктор біологічних наук,  
професор, академік НАН України

Київ – 2020

## 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.

Точність процесу трансляції є ключовою для забезпечення клітинного гомеостазу та підтримки клітинної цілісності. Як відомо, гомохіральність синтезованих білків визначається їхніми складовими: L-амінокислотами та ахіральним гліцином. Натомість D-амінокислоти є компонентами клітинних стінок бактерій та регуляторними сполуками у нервовій та гуморальній системі еукаріот тощо, їхні інші фізіологічні ролі в біологічних системах були оцінені нещодавно. А відтак забезпечення точності відбору правильного енантіомеру амінокислоти є критично важливим та значущим на перших етапах біосинтезу білка.

Апарат трансляції має кілька «пунктів контролю», що забезпечують відбір L-амінокислот для синтезу білків. Першим контрольним пунктом є аміноацил-тРНК синтетази (АРСази), що здебільшого селективно активують лише L-енантіомери відповідних амінокислот. Але оскільки специфічність цих ферментів не абсолютна, деякі АРСази можуть помилково активувати схожі амінокислоти. А тому другим контрольним механізмом є редагування неспоріднених продуктів або в корегувальному домені АРСаз, за його наявності

(*цис*-редагування), або за допомогою додаткових *транс*-редагувальних білкових факторів (родина AlaXp – гомологів редагувального домену АлаРС, YbaK – вільнодоступний білок для допомоги ПроРС, та ДТД – D-аміноацил-тРНК деацилаза, що гідролізує D-аміноацил-тРНК). Наступною точкою контролю у біосинтезі білка є дискримінація L/D-субстратів фактором елонгації Tu (EF-Tu) у бактерій та eEF-1A в архей та еукаріотів. Останнім є етап контролю неспоріднених та неприродних амінокислот на рівні рибосоми. Пептидил-трансферазний сайт рибосоми здатний розрізняти природу L/D-пептиду, таким чином виключаючи D-амінокислоти з апарату трансляції.

Щоправда, варто зауважити, що роль *цис*-редагувальних факторів у забезпеченні стереоселективності у апараті трансляції залишається недостатньо дослідженою, а відтак існує потреба у з'ясуванні механізмів відбору L-аміноацил-тРНК АРСазами різних структурних класів. Дотепер не було відомо щодо потенційної можливості АРСаз у корегуванні D-аміноацил-тРНК у редагувальних доменах, які містять ці ферменти. Окрім того, механізм гідролізу D-аміноацил-тРНК за участі ДТД залишався недостатньо вивченим.

Тому метою дисертаційної роботи було вивчення ролі АРСаз – представників I (ТирРС) та II (АлаРС) класів – у забезпеченні стереоспецифічної селекції амінокислот, а також з'ясуванню механізму гідролізу субстратів тРНК з активованими D-амінокислотами за допомогою ДТД.

Вибір ТирРС є логічним з огляду на унікальність цієї синтетази у розпізнаванні енантіомерів тирозину (має найнижчу стереоспецифічність серед синтетаз) та можливості приєднання L-Тир як до 2'-, так і до 3'-гідроксильної групи рибози кінцевого (A76) аденозину тРНК<sup>Тир</sup>. Сайти приєднання D-Тир дотепер були нез'ясованими. В свою чергу АлаРС є цікавим представником II класу АРСаз, що може помилково активувати ахіральний гліцин та серин, а також містить редагувальний домен для корекції власних помилок. Однак чи може АлаРС також активувати D-енантіомери аланіну та серину і редагувати неспоріднені D-аміноацильовані субстрати залишалося невідомим.

Аналіз кінетичних параметрів ( $k_{cat}$  та  $K_m$ ) активації гомологічних та негомологічних амінокислот у реакції пірофосфатного (АТФ-ФФ<sub>н</sub>) обміну показав, що ТирРС *Thermus thermophilus* (ТирРС) не виявляє достатньої дискримінації між D- та L-Тир (фактор дискримінації становить лише 1:24). Відсутність суттєвого розрізнення субстратів спостерігалася також і на етапі формування аміноацил-тРНК<sup>Тир</sup> (1:19). Стосовно АлаРС, вперше було показано її можливість активувати D-Ала та D-Сер з рівнями дискримінації 1:467 та 1:180 645, а також приєднувати їх до тРНК<sup>Ала</sup>. Рівні активації Глі (1:193) та L-Сер (1:237) для АлаРС узгоджуються з отриманими для мутантної форми АлаРС *E. coli* (С666А), «нездатної до корекції помилок», і становлять 1:207 та 1:107 відповідно. Активація D-Ала та D-Сер була також перевірена на АлаРС (С666А) *E. coli*. Показано, що ймовірність включення цих амінокислот становить 1:333 та 1:67 416 і корелює з даними, отриманими на АлаРС *T. thermophilus*. А отже, ми встановили, що D-амінокислоти мають різний рівень афінності та ймовірність активації у АРСаз I та II класу.

Отримання дезокси-модифікованих по 2'- і 3'-положеннях рибози кінцевого аденозину (2'- і 3'-dA76 тРНК<sup>Тир</sup>) тРНК<sup>Тир</sup> та аналіз даних кінетичних досліджень дозволили нам з'ясувати первинний сайт прикріплення D-Тир до тРНК<sup>Тир</sup> і визначити роль останньої у процесі гідролізу D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup>. Було встановлено, що 2'-ОН група тРНК<sup>Тир</sup> відіграє подвійну роль: з одного боку вона є сайтом приєднання D-Тир за участі ТирРС, а з іншого – необхідна для гідролізу D-аміноацил-тРНК за допомогою ДТД.

Аналіз активності ДТД з *T. thermophilus* (ДТД) в реакціях деацилювання субстратів А76/2'd/3'd тРНК<sup>Тир</sup> підтвердив важливість обох гідроксильних груп тРНК<sup>Тир</sup> для гідролізу D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup>. Дані комп'ютерного моделювання D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> у комплексі з ДТД та запропонована модель гідролізу цих комплексів на основі квантово-хімічних розрахунків повністю узгоджуються з експериментальними дослідженнями. Було встановлено, що ключовим фактором для гідролізу D-аміноацил-тРНК за участі ДТД є наявність 2'-ОН групи кінцевого А76 D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> та двох молекул води. Показано також

важливість для процесу гідролізу основного ланцюга карбонільних груп амінокислот Gly137-Pro138 та Ala127-His128 ферменту. Жоден з бічних радикалів амінокислот в активному сайті ДТД не виявив суттєвого впливу на механізм каталізу.

В біохімічних тестуваннях з [ $^{32}\text{P}$ ]-міченими тРНК<sup>Ала</sup> (Глі/L-Ала/D-Ала-тРНК<sup>Ала</sup>) було також встановлено, що АлаРС здатна ефективно гідролізувати D-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> на відміну від ДТД, що не виявляла жодної здатності до гідролізу. Натомість Глі/L-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> гідролізувалися як синтетазою, так і деацилазою. Таким чином, було встановлено роль редагувального домену АлаРС у забезпеченні стереоспецифічної селекції амінокислоти.

Отримані результати дозволили нам сформулювати еволюційну гіпотезу встановлення механізму стереоспецифічної селекції амінокислот в апараті трансляції, що базується на залученні/незалученні ДТД у цей процес.

Отже, у дисертаційній роботі було встановлено, що АлаРС як представник II класу АРСаз також може як активувати D-амінокислоти, так і редагувати ці помилки енантіоселективного відбору. Розкрито механізм гідролізу D-аміноацил-тРНК за участі *транс*-редагувального фактора ДТД та показана 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.

## Список публікацій здобувача за темою дисертації:

### Статті у наукових фахових виданнях:

1. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Kryklyvyi I., Tukalo M. (2015) Cloning, expression and purification of D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>-deacylase from *Thermus thermophilus*. *Biopolymers & Cell*, 31 (3), 179-186. DOI: 10.7124/bs.0008DE. *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, переклонування 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<sup>Tyr</sup> 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 мРНК<sup>Tyr</sup>, 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/bs.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/BSJ20180910. *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, отримання мутантних форм деацилази (мутагенез, очищення білків) та модифікованих препаратів мРНК<sup>Tyr</sup>, 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<sup>Ала</sup>, біохімічні тестування, обробка результатів, написання статті та підготування її до друку.*

### Тези наукових доповідей на конференціях

6. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2014 October) Cloning, expression and purification of D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>-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<sup>Tyr</sup>-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) – 1<sup>st</sup> place oral talk award.

8. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2015 September) D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>-deacylase from *Thermus thermophilus* (DTDDT): 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. 39) – 2<sup>nd</sup> 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) – 1<sup>st</sup> 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, 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” & 2<sup>nd</sup> 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). – 3<sup>rd</sup> 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<sup>Tyr</sup> 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<sup>Tyr</sup> 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. 61-62).

17. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2018 September) The dual role of the 2'-OH group of A76 tRNA<sup>Tyr</sup> in the discrimination of D-Tyrosine during the first steps of translation. – 27<sup>th</sup> tRNA Conference, 23-28 September 2018, Strasbourg, France (Опубл. в *Abstract book*, P. 185) – 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. – 27<sup>th</sup> tRNA Conference, 23-28 September 2018, Strasbourg, France (Опубл. в *Abstract book*, P.189).

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., Bdzhola 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) – 1<sup>st</sup> 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. Tukalo 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. – 12<sup>th</sup> International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetases, 5-9 November 2019, Hangzhou, China (Опубл. в *Abstract book*, P. 21).

## 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<sup>Tyr</sup>, 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 ( $k_{\text{cat}}$  and  $K_{\text{m}}$ ) 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<sup>Tyr</sup> 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<sup>Ala</sup>. 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<sup>Tyr</sup>) tRNA<sup>Tyr</sup> and analysis of kinetic studies we elucidated the primary attachment site of D-Tyr to tRNA<sup>Tyr</sup> and determined the role of last one during the hydrolysis of D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>. We found that the 2'-OH group of tRNA<sup>Tyr</sup> 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<sup>Tyr</sup> substrates confirmed the importance of both hydroxyl groups of tRNA<sup>Tyr</sup> for hydrolysis of D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>. The data of computer simulations of D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup> 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<sup>Tyr</sup> 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 [<sup>32</sup>P]-labelled tRNA<sup>Ala</sup> (Gly/L-Ala/D-Ala-tRNA<sup>Ala</sup>) we also found that AlaRS was able to perform effective hydrolysis of D-Ala-tRNA<sup>Ala</sup> unlike DTD, which did not exhibit any hydrolytic ability. In contrast, Gly/L-Ala-tRNA<sup>Ala</sup> 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.

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

#### **Articles**

1. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Kryklyvyi I., Tukalo M. (2015) Cloning, expression and purification of D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>-deacylase from *Thermus thermophilus*. *Biopolymers & Cell*, 31 (3), 179-186. DOI: 10.7124/bc.0008DE.

2. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O. P., Tukalo M. A. (2018) The Dual Role of the 2'-OH Group of A76 tRNA<sup>Tyr</sup> in the Prevention of D-tyrosine Mistranslation. *Journal of molecular biology*, 430 (17), 2670-2676. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.06.036.

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.

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.

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.

### Conference abstracts

6. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2014 October) Cloning, expression and purification of D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>-deacylase (DTD) from *Thermus thermophilus*. – Materials of XI Ukrainian biochemical congress, 6-10 October 2014, Kyiv. – *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<sup>Tyr</sup>-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. – *Biopolymers and Cell*, 2015, 31 (Special Issue), P. 9. – 1<sup>st</sup> place oral talk award.

8. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2015 September) D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>-deacylase from *Thermus thermophilus* (DTDTT): cloning, expression, purification and detection of editing activity. – International Conference of the Young Scientists

(CYS-2015), 21-25 September, Kyiv. – *Abstract book*, P. 39. – 2<sup>nd</sup> 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. – *Biopolymers and Cell*, 2016, Vol. 32, № 5, P. 403. – 1<sup>st</sup> 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. – *Acta biochimica polonica*, Vol. 63, Suppl., 1/2016. – 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. – *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” & 2<sup>nd</sup> Conference for young scientists of the division of Biochemistry, physiology and Molecular Biology NAS of Ukraine (CYS-2017), 6-9 June 2017, Kyiv. – *Ukr. Biochem. J.*, 2017, Vol. 89, №3, P. 108. DOI: 10.15407/ubj89.03. – 3<sup>rd</sup> 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. – *FEBS journal* 2017, 284, P. 293-294. DOI: 10.1111/febs.14174.

14. **Rybak M. Yu.** (2018 May) The role of 2'- and 3'-hydroxyl groups of A76 tRNA<sup>Tyr</sup> at the first steps of translation quality control. – Conference of Young Scientists “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology”, 23-25 May 2018, Kyiv. – *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<sup>Tyr</sup> 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. – *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. – *Abstract book*, P. 61-62.

17. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2018 September) The dual role of the 2'-OH group of A76 tRNA<sup>Tyr</sup> in the discrimination of D-Tyrosine during the first steps of translation. – 27<sup>th</sup> tRNA Conference, 23-28 September 2018, Strasbourg, France. – *Abstract book*, P. 185. – 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. – 27<sup>th</sup> tRNA Conference, 23-28 September 2018, Strasbourg, France. – *Abstract book*, P. 189.

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. – *Abstract book*, P.7-8. – Plenary lecture.



20. **Rybak M. Yu.**, Volynets G., Kovalenko O., Starosyla S., Bdzhola 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. – *Abstract book*, P. 87. – 1<sup>st</sup> 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 Ukrainian biochemical congress, devoted 165-anniversary to I. Ya. Gorbachevskyi, 30 September-4 October 2019, Ternopil. – *Medical and Clinical Chemistry*, Vol. 21, №3 (Supplement), P. 43-44. – Oral talk award.

22. Tukalo 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. – 12<sup>th</sup> International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetases, 5-9 November 2019, Hangzhou, China. – *Abstract book*, P. 21.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	22
ВСТУП.....	24
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	31
1.1. Загальна характеристика процесу біосинтезу білка .....	31
1.2. Структурно-функціональні особливості аміноацил-тРНК-синтетаз.....	32
1.3. Роль аланіл- та тирозил-тРНК-синтетаз в апараті трансляції.....	37
1.4. Стереоспецифічність амінокислот у процесі трансляції та роль D-амінокислот у про- та еукаріотичних організмах.....	42
1.5. Процес контролю якості біосинтезу білка.....	49
1.6. Роль D-аміноацил-тРНК-деацилази у забезпеченні стереоспецифічної селекції амінокислот у процесі біосинтезу білка.....	52
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	57
2.1. Матеріали та обладнання.....	57
2.2. Методи роботи з клітинами <i>Escherichia coli</i> .....	59
2.2.1. Поживні середовища для росту бактеріальних клітин.....	59
2.2.2. Отримання електрокомпетентних клітин <i>E. coli</i> .....	59
2.2.3. Трансформація клітин <i>E. coli</i> методом електропорації.....	60
2.2.4. Отримання біомаси <i>E. coli</i> для індукції експресії рекомбінантних білків.....	60
2.3. Методи роботи з нуклеїновими кислотами.....	60
2.3.1. Дизайн олігонуклеотидів.....	60
2.3.2. Ампліфікація ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції.....	61
2.3.3. Сайт-спрямований мутагенез.....	62
2.3.4. Рестрикція та лігування фрагментів ДНК.....	64
2.3.5. Очистка плазмідної ДНК та електрофоретичне розділення її фрагментів.....	65

2.3.5.1. Виділення плазмідної ДНК за допомогою GeneJET Miniprep Kit.....	65
2.3.5.2. Виділення плазмідної ДНК з використанням Midi Prep (Nucleobond).....	65
2.3.5.3. Переосадження ДНК.....	65
2.3.5.4. Електрофорез в 1% агарозному гелі.....	66
2.3.6. Синтез тРНК <sup>Тир</sup> <i>in vitro</i> та електрофорез РНК у 8%-му ПААГ.....	67
2.3.7. Очистка препаратів тРНК.....	67
2.3.7.1. Очищення тРНК <sup>Тир</sup> методом аніонної хроматографії.....	67
2.3.7.2. Відщеплення ССА кінця тРНК <sup>Тир</sup> <i>Thermus thermophilus</i> .....	67
2.3.7.3. Очищення тРНК <sup>Тир</sup> методом ВЕРХ.....	67
2.3.7.4. Добудова ССА-кінця <i>T. thermophilus</i> тРНК <sup>Тир</sup> та синтез тРНК модифікованих за А76 – 2'dA76 тРНК <sup>Тир</sup> та 3'dA76 тРНК <sup>Тир</sup> .....	68
2.3.7.5. Очистка препаратів тРНК, модифікованих за А76 – 2'dA76 тРНК <sup>Тир</sup> та 3'dA76 тРНК <sup>Тир</sup> <i>T. thermophilus</i> .....	68
2.3.8. Окислення тРНК перйодатом натрію.....	68
2.4. Методи роботи з білками.....	69
2.4.1. Визначення концентрації білка методом Бредфорд.....	69
2.4.2. Електрофоретичне розділення білків у поліакриламідному гелі.....	69
2.4.3. Виділення та очистка рекомбінантної ДТД та її мутантних форм.....	69
2.4.3.1. Тест експресії ДТД в різних середовищах.....	69
2.4.3.2. Очищення ДТД методами афінної, аніон-обмінної та гель-фільтраційної хроматографії.....	70
2.4.3.3. Вестерн-блот аналіз ДТД до та після обробки TEV-протеазою.....	72
2.4.4. Виділення та очистка рекомбінантної АлаРС.....	72
2.4.5. Аналітична гель-фільтрація білків.....	73
2.5. Методи ферментативної кінетики.....	74
2.5.1. Отримання препаратів [ <sup>32</sup> P]-тирозил/гліцил/аланіл-тРНК.....	74

2.5.1.1. Перевірка функціональної активності отриманих препаратів тРНК <sup>Тир</sup> .....	74
2.5.1.2. Отримання [ <sup>32</sup> P]-мічених тРНК <sup>Тир</sup> та тРНК <sup>Ала</sup> .....	74
2.5.2. Реакції аміноацилювання за допомогою <i>T. thermophilus</i> ТирРС.....	75
2.5.3. Аналіз гідролізу АТФ у реакції з АлаРС та ТирРС.....	76
2.5.3.1. Тест на активність аміноацилювання препарату АлаРС.....	76
2.5.3.2. АТФ-ФФн обмін за участі АлаРС та ТирРС.....	76
2.5.4. Реакції аміноацилювання, деацилювання та загальний аналіз редагування за участі АлаРС.....	78
2.5.5. Аналіз гідролізу препаратів тирозил-тРНК <sup>Тир</sup> за участі ДТД та гліцил/аланіл-тРНК <sup>Ала</sup> за участі ДТД та АлаРС.....	79
2.6. Біоінформатичний аналіз та статистична обробка результатів.....	79
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>80</b>
3.1. Вивчення процесу аміноацилювання D-Тир за участі ТирРС <i>T. thermophilus</i> та ролі гідроксильних груп А76 тРНК <sup>Тир</sup> в ньому.....	80
3.1.1. Отримання модифікованих по 2'- та 3'-положеннях рибози А76 тРНК <sup>Тир</sup> .....	80
3.1.2. Вивчення кінетики аміноацилювання тРНК <sup>Тир</sup> за участі L/D-Тир у присутності ТирРС.....	81
3.1.3. Визначення основних сайтів приєднання L- і D- Тир до тРНК <sup>Тир</sup> .....	83
3.2. Отримання рекомбінантної АлаРС <i>T. thermophilus</i> .....	87
3.2.1. Експресія та очищення повнорозмірної АлаРС <i>T. thermophilus</i> з С-кінцевою полігістидиновою послідовністю та її характеристика.....	87
3.2.2. Активність очищеної АлаРС в реакції аміноацилювання.....	91
3.3. Каталітичні властивості АлаРС.....	93
3.3.1. Активація споріднених та неспоріднених амінокислот АлаРС.....	93
3.3.2. АлаРС помилково аміноацилює тРНК <sup>Ала</sup> за допомогою D-Ала та D-Сер.....	98
3.3.3. Вивчення загального рівня редагування за участі АлаРС.....	100

3.4. Клонування, експресія та очищення ДТД <i>T. thermophilus</i> (ДТД).....	102
3.4.1. Створення ДТД-експресуючої конструкції та експресія рекомбінантного білка в різних середовищах.....	102
3.4.2. Очищення Гіс-ДТД.....	104
3.4.3. Визначення молекулярної маси D-аміноацил-тРНК-деацилази <i>T. thermophilus</i> в нативних умовах.....	107
3.5. Визначення амінокислотних залишків, які входять до структури активного центру ДТД методом сайт-спрямованого мутагенезу.....	109
3.5.1. Вибір амінокислотних залишків для сайт-спрямованого мутагенезу деацилази.....	109
3.5.2. Отримання мутантних форм ДТД.....	112
3.5.3. Аналіз редагувальної активності мутантних форм ДТД щодо помилково аміноацильованих D-Тир-тРНК <sup>Тир</sup> .....	114
3.6. Роль тРНК <sup>Тир</sup> у процесі гідролізу помилково аміноацильованих D-Тир- тРНК <sup>Тир</sup> субстратів.....	120
3.6.1. Біохімічні властивості D/L-тирозил-2'd/3'dA76 тРНК <sup>Тир</sup> .....	120
3.7. Посттрансферне редагування помилково синтезованих D-аланіл-тРНК <sup>Ала</sup> за участі АлаРС.....	125
 РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	129
4.1. Механізм гідролізу D-Тир-тРНК <sup>Тир</sup> субстратів за участі ДТД <i>T. thermophilus</i> . Аналіз експериментальних даних та розрахунків на основі комп'ютерного моделювання.....	129
4.2. Порівняння даних комп'ютерних розрахунків з даними гідролізу D-Тир/D- Ала/-L-Ала-тРНК за участі <i>T. thermophilus</i> ДТД.....	137
4.3. Узагальнення даних, отриманих для ТирРС, АлаРС та ДТД <i>T. thermophilus</i> .....	140
 ВИСНОВКИ.....	146
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	147
ДОДАТОК А.....	166

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

A76	–	3' кінцевий аденозин тРНК
а.к.	–	амінокислота
АДФ	–	аденозиндифосфорна кислота
АлаРС	–	аланіл-тРНК-синтетаза
АлаРСТТ	–	аланіл-тРНК-синтетаза <i>T. thermophilus</i>
АМФ	–	аденозинмонофосфорна кислота
АРС, АРСаза	–	аміноацил-тРНК синтетаза
БСА	–	бичачий сиворотковий альбумін (bovine serum albumin)
ДСН	–	додецилсульфат натрію
ДТД	–	D-аміноацил-тРНК-деацилаза <i>T. thermophilus</i>
ДТТ	–	дитіотреїтол (dithiothreitol)
ЕДТА	–	етилендіамінтетраацетат
МД	–	молекулярна динаміка
ТирРС	–	тирозил-тРНК-синтетаза <i>T. thermophilus</i>
Тріс	–	тріс(гідроксиметил)амінометан (tris(hydroxymethyl)aminomethane)
кДа	–	кілодальтон
ос.ч.	–	особливо чистий
ПААГ	–	поліакриламідний гель
ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція
тРНК <sup>Тир</sup>	–	тирозинова тРНК
тРНК <sup>Ала</sup>	–	аланінова тРНК
ТХО	–	трихлороцтова кислота
DEAE	–	диетиламіноетил (diethylaminoethyl)
DTD	–	D-аміноацил-тРНК-деацилаза (D-aminoacyl-tRNA-

	–	deacylase)
EDTA	–	етилендіомінтетраоцтова кислота (ethylenediaminetetraacetic acid)
HEPES	–	4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонова кислота (4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid)
HPLC	–	високоєфективна рідинна хроматографія (high- pressure liquid chromatography)
IPTG	–	ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид (isopropyl-β- D-1-thiogalactopyranoside)
$k_{cat}$	–	каталітична константа ферментативної реакції
$K_m$	–	константа Міхаеліса-Ментен
PBS	–	натрій-фосфатний буфер (Phosphate buffered saline)
PEI-целюлоза	–	поліетиленімін-целюлоза
PMSF	–	фенілметансульфонілфлуорид (phenylmethylsulfonyl fluoride)
QM	–	квантово-механічний, квантова механіка (quantum mechanics)
RMSD	–	кореневе середньоквадратичне відхилення (root- mean-square deviation)
PSA	–	персульфат амонію (ammonium persulfate)
TEMED	–	тетраетилендіамін (tetramethylethylenediamine)
TEV-протеаза	–	протеаза вірусу гравірування тютюну (Tobacco Etch Virus)

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Аміноацил-тРНК синтетази (АРСази) є високоспецифічними ферментами апарату трансляції, що активують амінокислоти та приєднують їх до споріднених тРНК [1]. 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 [2], однак через відсутність редагувального домену гідроліз D-аміноацил-тРНК здійснює D-аміноацил-тРНК-деацилаза, що має широку субстратну специфічність [3-5].

Вивчення механізмів контролю якості біосинтезу білка за участі АРСаз викликає інтерес дослідників вже не перше десятиліття [6-8], 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 [9], а також аспартил-тРНК синтетаза [10] 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; «Патології людини: від молекулярного до клітинного рівня» (2013-2016), номер державної реєстрації 0113U002831; «Патології людини: від молекулярного до клітинного рівня» (2017), номер державної реєстрації 0117U003259; 2.2.4.20 «Нові підходи до мішень-спрямованого пошуку потенційних протипухлинних та протиінфекційних засобів для подолання проблеми резистентності до ліків» (2017–2021), номер державної реєстрації 0117U000204; «Мішень-спрямований пошук інгібіторів аміноацил-тРНК синтетаз із селективною дією проти збудників інфекційних хвороб людини» (2015-2019), номер державної реєстрації 0115U002945.

**Мета і завдання досліджень.** Метою дисертаційної роботи є з'ясування ролі тирозил- та аланіл-тРНК-синтетази, 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<sup>Тир</sup>-деацилази *T. thermophilus* (ДТД), розробити методику експресії цього гена в клітинах *E. coli* та процедуру очищення рекомбінантного білка.

3. Одержати *in vitro* транскрипти тРНК<sup>Тир</sup>, отримати тРНК дикого типу та дезокси-форми, модифіковані по 2'- або 3'-положеннях рибози кінцевого аденозину (2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> та 3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup>) 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<sup>Тир</sup> 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<sup>Тир</sup> у процесі гідролізу ДТД помилково аміноацильованих D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> субстратів.

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

9. З'ясувати можливість посттрансферного редагування помилково аміноацильованих гліцил/D-аланіл-тРНК<sup>Ала</sup> 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<sup>Тир</sup>, [<sup>32</sup>P]-мічення тРНК<sup>Тир</sup> та тРНК<sup>Ала</sup>, методи ферментативної та неферментативної кінетики з [<sup>32</sup>P]/[<sup>14</sup>C]-радіоактивними мітками, електрофорез білків та нуклеїнових кислот, хроматографічні методи (афінна, іонообмінна, гель-фільтраційна, тонкошарова хроматографії), 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<sup>Тир</sup> за участі ДТД, в якому ключову роль відіграє вільна 2'-гідроксильна група А76 тРНК<sup>Тир</sup> та беруть участь дві молекули води. Отримані експериментальні дані (сайт-спрямованого мутагенезу активного центру ДТД, ферментативної кінетики із різними тРНК<sup>Тир</sup> субстратами) повністю узгоджуються з даними комп'ютерного моделювання (молекулярної динаміки та квантово-хімічних розрахунків) щодо запропонованого механізму гідролізу D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup>. Встановлено подвійну роль 2'-ОН групи А76 тРНК<sup>Тир</sup> в аміноацилюванні D-Тир та гідролізі D-аміноацил-тРНК.

Уперше показано здатність АлаРС аміноацилювати тРНК<sup>Ала</sup> 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<sup>Ала</sup>. 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<sup>Ала</sup> 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<sup>Тир</sup> дикого типу та її похідних 2'- і 3'-дезоксидеокси А76 тРНК<sup>Тир</sup>, отримано [<sup>32</sup>P]-препарати тРНК<sup>Тир</sup> та тРНК<sup>Ала</sup>, 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<sup>Тир</sup>, радіоактивного мічення тРНК за допомогою [<sup>32</sup>P]-АТФ та аналізу їхньої активності. Разом із к.б.н. Гудзерею О. Й. отримано препарати АлаРС та тРНК<sup>Ала</sup>. Очистка тРНК<sup>Тир</sup>/тРНК<sup>Ала</sup>/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<sup>Тир</sup>

відповідно, а також к.б.н. Гудзері 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<sup>Ала</sup>. 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, 6-10 жовтня 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, Ukraine, 26-27 May, 2015), International Conference of the Young Scientists (CYS-2015) (Kyiv, 21-25 September), X Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (Kyiv, 26-27 May 2016), X Parnas Conference Young Scientist Forum “Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine” (Wroclaw, Poland, 10-12 July, 2016), IX International meeting “From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies” (Lviv, 20-22 September 2016), Meeting of the 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” & 2<sup>nd</sup> Conference for young scientists of the division of Biochemistry, physiology and Molecular Biology NAS of Ukraine (Kyiv, 6-9 June 2017), 42nd FEBS Congress “From molecules to cells and back” (Jerusalem, Israel,

10-14 September, 2017), Conference of Young Scientists “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” (Kyiv, 23–25 May 2018), XI Parnas Conference – Young scientists forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine” (Kyiv, 3-5 September 2018), EMBO Workshop “Enzyme, biocatalysis and chemical biology: The new frontiers” (Pavia, Italy, 09-12 September 2018), 27<sup>th</sup> tRNA Conference (Strasbourg, France, 23-28 September 2018), XIII International Young Scientists’ Conference “Biology: from a molecule up to the biosphere” (Kharkiv, Ukraine, 28-30 November 2018), FEBS Practical Course: Biomolecules in Action II (Hamburg, Germany, 23-28 June 2019), XII Українському біохімічному конгресі, присвяченому 165<sup>й</sup> річниці від дня народження І. Я. Горбачевського (Тернопіль, 30 вересня-4 жовтня 2019), 12<sup>th</sup> 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.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Загальна характеристика процесу біосинтезу білка

Процес синтезу поліпептидів з амінокислот, більш відомий як трансляція, є фундаментальним метаболічним процесом, за якого генетична інформація у вигляді послідовності нуклеотидів мРНК використовується для перекладу у амінокислотний текст. Відповідність амінокислоти, що стоїть у певному положенні, під час білкового синтезу визначається спарюванням кодона мРНК з певною аміноацил-тРНК [1]. За участі факторів елонгації аміноацил-тРНК транспортуються до рибосоми. Таким чином, кодони мРНК зчитуються різними тРНК на рибосомі, в свою чергу амінокислоти, приєднані до тРНК, поєднуються пептидними зв'язками, формуючи поліпептид. Коли рибосома під час сканування досягає стоп-кодону, поліпептид вивільняється з рибосоми і набуває певного рівня вторинної/третинної/четвертинної організації.

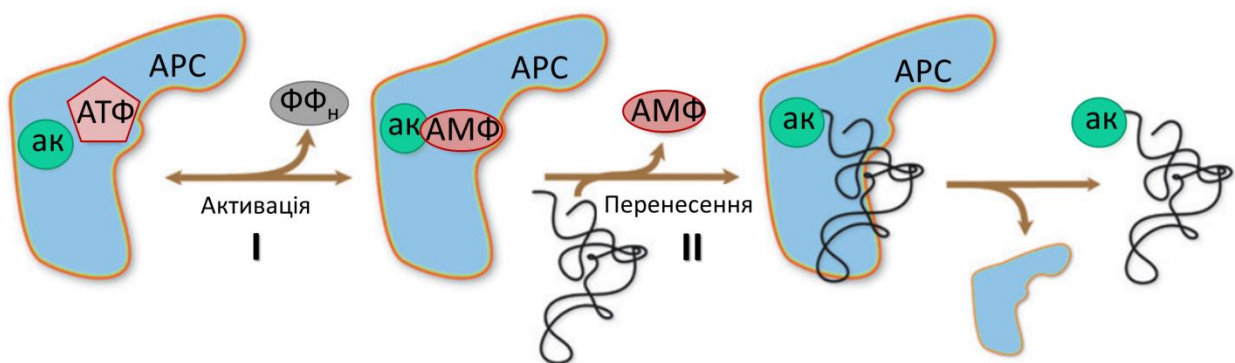
У 1955 році Ф. Кріком було запропоновано адапторну гіпотезу [11], згідно з якою відповідність між триплетом нуклеотидів і амінокислотою встановлюється не під час біосинтезу білка на рибосомі, а в процесі приєднання амінокислоти до певної молекули тРНК. Ця гіпотеза була експериментально підтверджена [12, 13] і використовується для розкриття процесів реалізації точності генетичного коду. Виявлено низькомолекулярну розчинну фракцію РНК та специфічний ензим, що приєднує амінокислоти до РНК. Показано, що утворена сполука, тобто аміноацил-РНК, є субстратом для біосинтезу білка [13, 14]. Згодом цю РНК буде названо транспортною (тРНК), а фермент – аміноацил-тРНК синтетазою (АРСазою).

АРСази є високоспецифічними ферментами, що визначають точність біосинтезу білка. Для забезпечення точності трансляції деякі АРСази мають

також редагувальну властивість, виконуючи претрансферну (на етапі утворення аміноацил-АМФ) чи посттрансферну (після формування помилкових комплексів аміноацил-тРНК) корекцію помилок в процесі аміноацилювання. Зважаючи на важливість цього процесу у біосинтезі білка, він може бути перспективною мішенню для розробки нових лікарських протимікробних препаратів. А відтак, детальне вивчення механізмів аміноацилювання та деацілювання за участі АРСаз є необхідним для розробки нових фармакологічних мішеней, а також для створення нових ортологічних пар тРНК-АРСаза для включення негомологічних амінокислот в білки у сфері синтетичної біології.

## 1.2. Структурно-функціональні особливості аміноацил-тРНК синтетаз

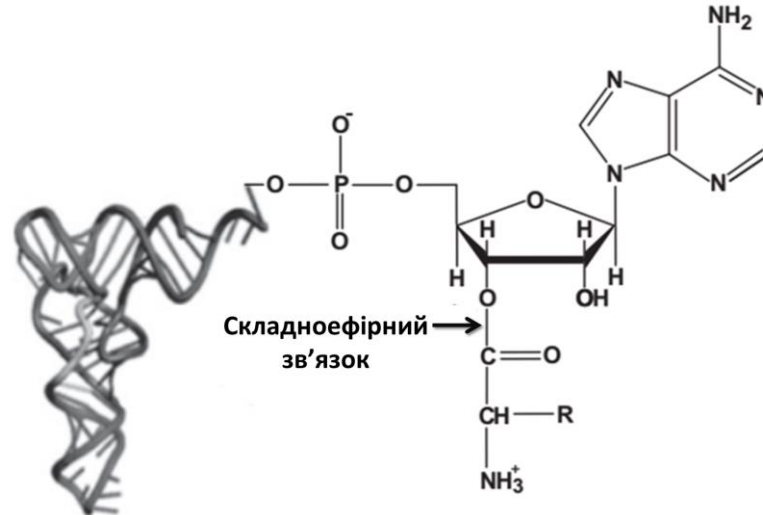
АРСази приєднують амінокислоти (ак) до відповідних тРНК у двохстадійній реакції: 1) активація амінокислоти за участі АТФ з утворенням комплексів аміноацил-аденілатів (ак-АМФ) та вільного неорганічного пірофосфату ( $\text{ФФ}_n$ ) та 2) перенесення активованої амінокислоти до 3'-кінця тРНК з утворенням аміноацил-тРНК [1, 15] (рис. 1.1).



**Рис. 1.1.** Схематична ілюстрація ферментативної реакції аміноацилювання тРНК за участі АРСаз (АРС – АРСаза, ак – амінокислота,  $\text{ФФ}_n$  – неорганічний пірофосфат). Адаптовано з [8]



Варто зазначити, що приєднання амінокислот може відбуватися як до 2'-, так і до 3'-гідроксильної групи термінального аденіну А76 тРНК з формуванням складнофірного зв'язку (рис. 1.2).



**Рис. 1.2.** Хімічна структура складнофірного зв'язку в молекулі аміноацил-тРНК. Залишок амінокислоти приєднано до 3'-ОН рибози. Адаптовано з [16]

Відомо 20 АРСаз, кожна з яких відповідає 20 стандартним амінокислотам. Відповідно до структури активного центру ці ферменти поділяються два класи I та II [17-19] (рис. 1.3). Кожна з АРСаз належить до I або II класу, за винятком лізил-тРНК синтетази (ЛізРС), що має представників у обох класах. У межах кожного класу виділяють субкласи a, b та c, що базуються на відносних послідовностях та структурній схожості. Активний центр ферментів класу I являє собою нуклеотид-зв'язувальну укладку Россмана [18], що характеризується наявністю двох висококонсервативних амінокислотних мотивів HIGH та KMSKS. Укладка Россмана зв'язує АТФ та амінокислоту, ініціюючи каталіз [1]. Окрім того АРСази цього класу приєднують відповідні амінокислоти до 2'-ОН групи рибози тРНК; винятком із цього правила є цистеїніл-тРНК синтетаза (ЦисРС) та тирозил-тРНК синтетаза (ТирРС), що можуть приєднувати L-Цис та L-Тир як до 2'-, так і до 3'-ОН груп тРНК відповідно [20]. До того ж будучи структурно схожою на АРСази класу I,

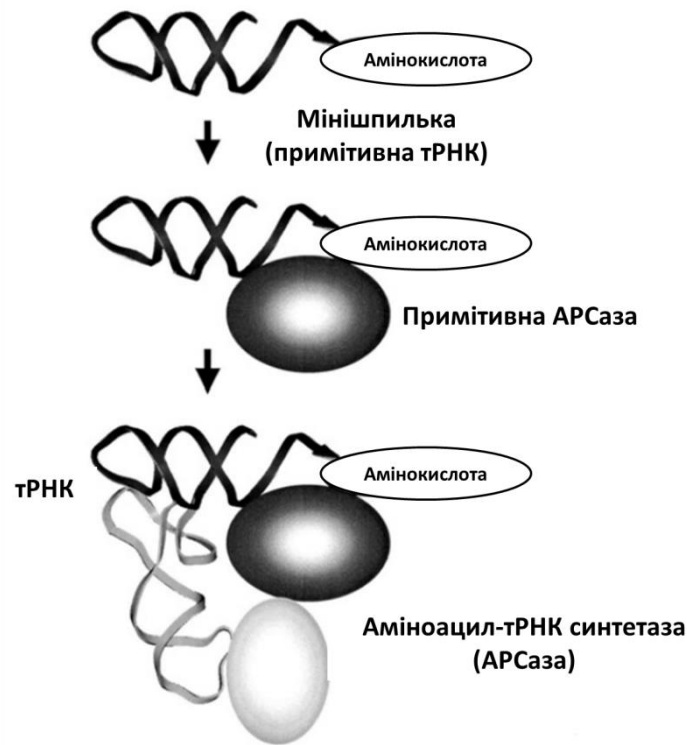
ТирРС має тип розпізнавання тРНК<sup>Тир</sup>, характерний для класу II [21]. Молекулярні основи такого феномену для ЦисРС були з'ясовані [22], однак для ТирРС вони були донедавна невивченими, а відтак послуговували об'єктом нашого дослідження. В свою чергу представники класу II АРСаз зазвичай існують у димерній або тетрамерній формі, мають структуру активного центру у вигляді β-листка, який складається з 7 антипаралельних β-тяжів, фланкованих α-спіралями, та приєднують відповідні амінокислоти до 3'-ОН групи тРНК. Винятком є аспарагін-тРНК синтетаза (АснРС) та аспартат-тРНК синтетаза (АспРС), що здатні також приєднувати амінокислоти до обох груп рибози тРНК [23]. Варто зауважити, що останнє десятиліття велика увага дослідників була зосереджена на вивченні неканонічних представників родини АРСаз: 21 (селеноцистеїніл-) [24] та 22 (піролізил-тРНК-синтетази) [25, 26], оскільки вони становлять неабиякий інтерес для репрограмування генетичного коду для потреб синтетичної біології.

<b>Клас I</b>	<b>Клас II</b>
1a	2a
Лейцин* Ізолейцин* Валін* Аргінін Цистеїн Метіонін	Серин Треонін* Аланін* Пролін* Гліцин Гістидин
1b	2b
Глутамат Глутамін Лізин-I	Аспартат Аспарагін Лізин-II
1c	2c
Тирозин Триптофан	Фенілаланін*

**Рис. 1.3.** Класифікація аміноацил-тРНК синтетаз (адаптовано з [27],

\*вказує на наявність редагуючого домену)

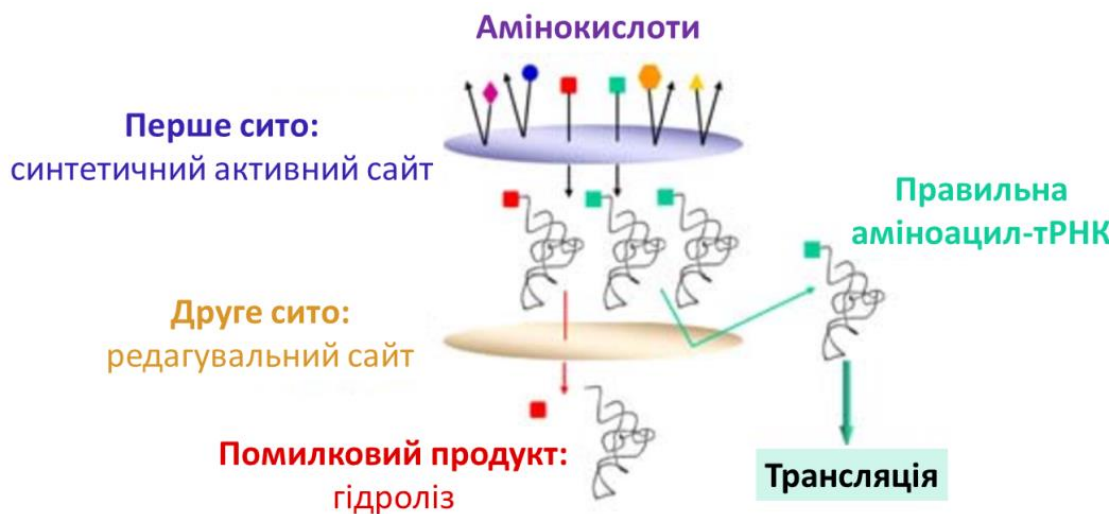
Незважаючи на те, що два класи АРСаз не мають спільних предків, вважається, що стародавні АРСази мали лише каталітичний домен (рис. 1.4), а під час еволюції [28], АРСази отримали кілька різних додадкових доменів, включаючи домени редагування [29].



**Рис. 1.4.** Потенційний еволюційний процес аміноацилювання тРНК (мінішпилька являє собою попередника тРНК). Адаптовано з [30]

Як відомо, Л. Полінгом вперше була поставлена проблема точності відбору амінокислот АРСазами і розрахована можливість зв'язування неспорідненого валіну (1:200) в активному сайті ізолейцил-тРНК синтетази (ІлеРС) [31]. На основі подальших досліджень ІлеРС щодо рівня помилок під час трансляції, Р. Лотфільдом було розраховано, що насправді це співвідношення становить 1:3000, що означає наявність у АРСази редагувального домену [32]. Враховуючи отримані дані, А. Ферштом було запропоновано модель «подвійного сита» (рис. 1.5) для пояснення високої точності аміноацилювання [33, 34]. Згідно з цією моделлю синтетичний

активний центр виступає в ролі першого грубого сита, що може зв'язувати та активувати споріднений субстрат так само як і менші чи однакові за розміром інші амінокислоти, відсіваючи лише більші. З огляду на хімічну та дискримінацію за розміром, редагувальний сайт (за його наявності) є другим ситом, вибірково гідролізуючи помилково синтезовані неспоріднені субстрати [34]. Представники родини АРСаз як I (ЛейРС, ІлеРС, ВалРС), так і II класів (АлаРС, ТреРС, ПроРС, ФенРС) можуть мати корегувальні домени. Крім того функцію редагування можуть проявляти також АРСази, які не мають такого домена, як от МетРС та СерРС. Таким чином, механізми корегування помилково утворених субстратів за участі АРСаз можуть відбуватися різними шляхами: на етапі утворення аміноацил-аденілатів, тобто претрансферно, або на стадії утворення аміноацил-тРНК, тобто посттрансферно.



**Рис. 1.5.** Модель «подвійного сита». Адаптовано з [35]

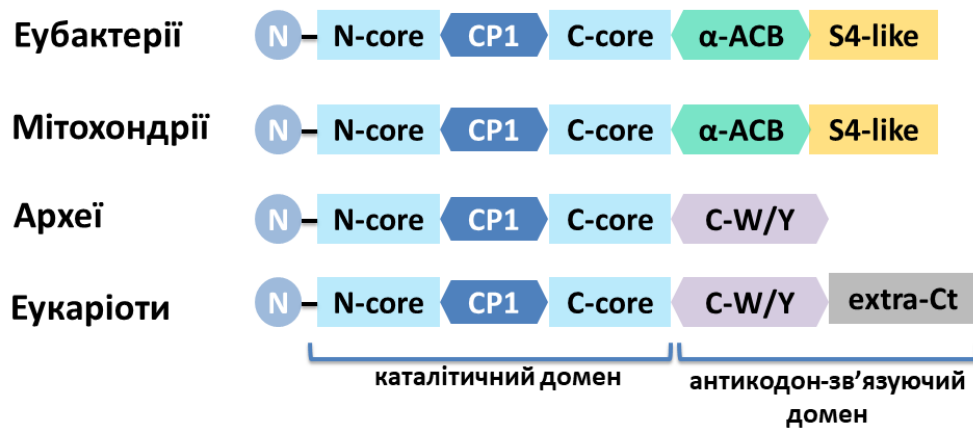
А отже, редагування за участі АРСаз відбувається шляхом коригування неспоріднених субстратів, а вивчення молекулярних механізмів їхньої помилкової активації та гідролізу привертають неабияку увагу дослідників останнє десятиліття.

### 1.3. Роль аланіл- та тирозил-тРНК синтетаз в апараті трансляції

Тирозил- та аланіл-тРНК синтетази є віддаленими представниками класу АРСаз. Відомо, що аланіл-тРНК синтетаза (АлаРС), член II класу, є одним із найбільш стабільних представників цього класу (разом з ГліРС, ЛейРС, ІлеРС та ВалРС) [36]. В свою чергу тирозил-тРНК синтетаза (ТирРС), що належить до класу I, є пізнім учасником біосинтетичного апарату [37].

АлаРС може помилково активувати як меншу за розміром амінокислоту гліцин, так і більшу – L-серин і гідролізувати помилково утворені субстрати з тРНК [38] у редагувальному домені. Не маючи домену для редагування, ТирРС ефективно активує обидва енантіомери тирозину [3], однак цю проблему вирішує наявність D-аміноацил-тРНК деацилази (ДТД), *транс*-редагувального фактора, який руйнує складноєфірний зв'язок між деякими D-амінокислотами та тРНК [3, 39]. Про те, чи може АлаРС, представник II класу АРСаз, також активувати D-енантіомери амінокислот (D-аланіну чи D-серину) дотепер залишалось невідомим, а відтак це питання досліджувалось у нашій роботі.

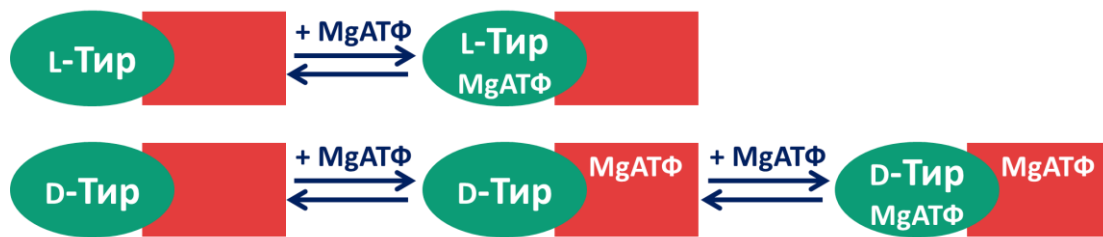
ТирРС різних царств організмів є гомодимерами з N-кінцевим доменом, що містить активний центр у вигляді паралельного нуклеотид-зв'язуючої складки, представленою  $\beta$ -щитом або укладкою Россмана. Однак два основних мотиви АРСаз I класу – HIGH та KMSKS – не є строго консервативними у ТирРС і мають вигляд HAYL та KFGKT. Крім того різні представники ТирРС мають свої особливості структурної організації: мітохондріальна та еубактеріальна ТирРС відрізняються від еукаріотичної та архейної наявністю  $\alpha$ -спірального антикодон-зв'язуючого домену ( $\alpha$ -АСВ) та S4-подібного домену, що має високу гомологію з C-термінальним доменом рибосомального білка S4 (рис. 1.6) [40].



**Рис. 1.6.** Структурна організація ТирРС різного походження. Кожен структурний домен ТирРС позначено певним кольором і символами: (N) – N-кінцевий мотив, (N-core) і (C-core) – N- і C-частини каталітичного домену, (CP1) – сполучний пептид, ( $\alpha$ -ACB) –  $\alpha$ -спіральний антикодон-зв'язуючий домен, (C-W/Y) – C-кінцевий домен, гомологічний до ТрпРС, (S4-like) – S4-подібний домен та (extra-Ct) – додатковий C-термінальний домен (адаптовано з [41, 42])

Хіральна дискримінація амінокислот під час аміноацилювання відбувається в активному центрі АРСази [43]. Дослідниками А. Шеоран та Е. Фьорстом було показано, що D-тирозин індукує кооперативне зв'язування АТФ у ТирРС (рис. 1.7). У разі активації D-тирозин його зв'язування знижує спорідненість, з якою активна субодиниця синтетази зв'язується з АТФ, ініціюючи зв'язування АТФ у неактивній субодиниці. В свою чергу зв'язування АТФ з неактивною субодиницею викликає конформаційну зміну фермента, що призводить до підвищення афінності АТФ до активної субодиниці. Ця конформаційна зміна є стабільною протягом багаторазових оборотів ферменту у процесі каталізу [44]. Таким чином, у випадку зв'язування D-тирозину відбувається зниження спорідненості ТирРС до АТФ, що може пояснити дещо нижчу каталітичну активність синтетази щодо активації D-тирозину порівняно з L-формою. Однак, незважаючи на виявлений дослідниками інтерес до ТирРС,

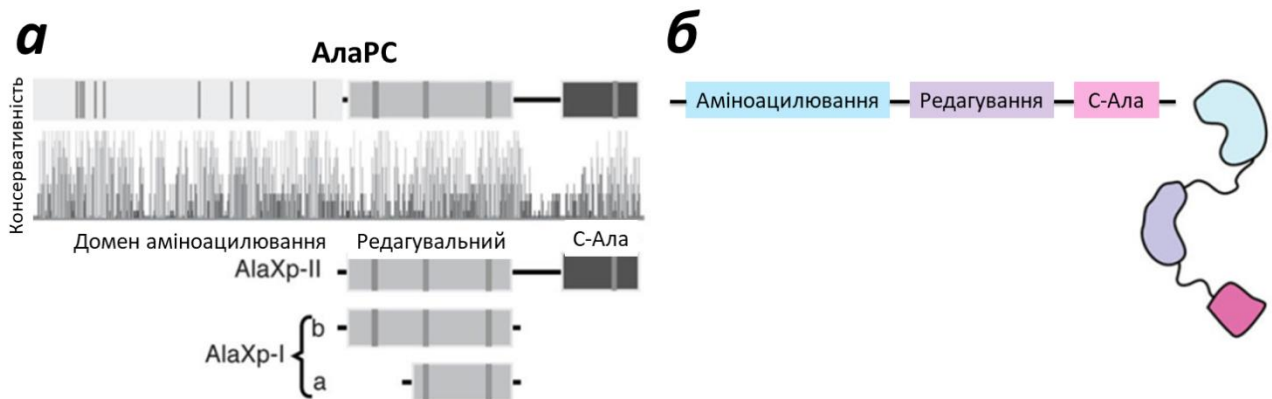
невідомими донедавно залишалися сайти приєднання D-тирозин до тРНК<sup>Тир</sup>, а відтак це питання також вивчалось у ході нашої роботи.



**Рис. 1.7.** Модель зв'язування АТФ з ТирРС у присутності D-Тир на основі даних кінетики ТирРС *B. stearothermophilus*. Для порівняння також показано зв'язування АТФ з ферментом у присутності L-тироzinу. Нефункціональні (неактивні) та функціональні (активні) мономери ТирРС представлені у вигляді прямокутників та овалів відповідно. Адаптовано з [44]

Аланіл-тРНК синтетаза належить до II класу і складається з чотирьох доменів (рис. 1.8): N-кінцевий (активний центр), редагувальний домен, домен розпізнавання тРНК та C-кінцевий домен (C-Ала), який відповідає за олігомеризацію [45]. Домен C-Ала також має субдомен, що відіграє важливу роль у реакціях аміноацилювання та редагування [46]. У різних організмів АлаРС може мати різну четвертинну структуру: у вигляді тетрамеру (*Escherichia coli*) [47], димеру (*Thermus thermophilus HB8*) [48], або мономеру (*Bombyx mori*) [49]. Варто зазначити, що ця синтетаза має особливу історію свого дослідження: з одного боку, АлаРС *E. coli* – перша аміноацил-тРНК синтетаза, яка була клонована, секвенована [50], охарактеризована генетично [51] та біохімічно [52, 53]; з іншого боку, лише після 25 років досліджень була отримана перша кристалічна структура АлаРС для N-кінцевого каталітичного фрагмента ферменту *Aquifex aeolicus* [54]. Згодом було отримано структуру каталітичного центру АлаРС *E. coli* з різними мутаціями в лейциновій застібці (leucine zipper) в комплексі з гліцином, L-аланіном та L-серіном [55]. Пізніше структуру АлаРС *E. coli* було досліджено за допомогою методу модифікованої

лейцинової напів-застібки (leucine half-zipper technique) [56], а взаємодії між тРНК<sup>Ала</sup> та синтетазою були вивчені методом ізотермічної титраційної калориметрії (ІТС) [57].



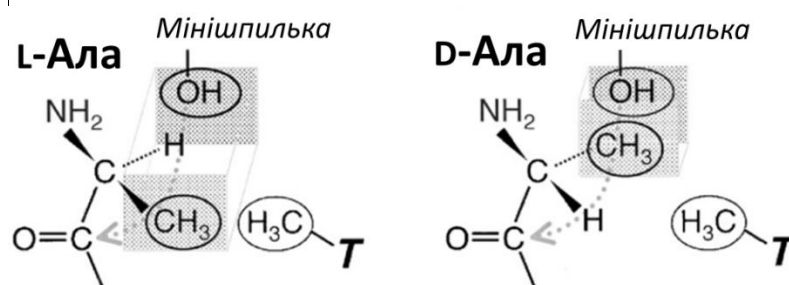
**Рис. 1.8.** Структурна організація АлаРС (адаптовано з [46]). (а) Схема висококонсервативного каталітичного домену АлаРС протягом еволюції. Панель консервативності демонструє відносну ідентичність послідовностей 410 вирівняних послідовностей АлаРС. Сірими вертикальними смугами показано строго консервативні залишки амінокислот в кожній групі. (б) Схема доменної організації АлаРС

Аланінова система також цікава в контексті розпізнавання тРНК. тРНК<sup>Ала</sup> містить унікальну некомплементарну (wobble) пару G3:U70 в акцепторному стеблі, що визначає її специфічність до АлаРС [58]. Нещодавно опубліковано перший комплекс архейної АлаРС з *Archaeoglobus fulgidus* у двох станах – з тРНК<sup>Ала</sup> з G3:U70 парою та з тРНК<sup>Ала</sup> з варіантом A3:U70 [59]. Цікаво, що АлаРС людини може помилково активувати тРНК з G4:U69 парою, що є своєрідним еволюційним посиленням функції синтетази, а не звичайною випадковою помилкою [60]. Домен С-Ала людини еволюційно втратив функціональну роль у редагуванні та аміноацилюванні [46], як це повідомлялося для прокариот, та у ході еволюції перетворився на ядерний ДНК-зв'язувальний білок [61]. Нещодавно Чонг з колегами повідомили про три різні



стратегії в G3:U70 розпізнаванні серед царств життя. [62]. Пряма система позитивного впізнавання нуклеотидних детермінант у бактерій є більш уразливою до мутацій фермента, що змінюють його специфічність. З іншого боку, для АлаРС *E. coli* показано, що пара G3:U70 є важливим елементом для специфічної взаємодії з редагувальним доменом фермента [58]. Натомість АлаРС людини більш толерантна до втрати специфічності головним чином тому, що такі зміни мало впливають на її активність щодо природньої G3:U70 тРНК<sup>Ала</sup>. Це спостереження викликає можливість того, що фермент людини розвинув свій механізм специфічності, пов'язаний з формою, щоб протистояти наслідкам інактивуючих ефектів мутацій висококонсервативних залишків N317 та D416. А отже, відсутність будь-якої позитивної функціональної взаємодії в еукаріотичній та архейних системах існує на противагу доволі сприятливого контакту між карбоксильною групою D416 та 2-NH<sub>2</sub> та G3 в *E. coli*, що свідчить про те, що консервативна G:U пара була зафіксована як елемент ідентичності на початку еволюції генетичного коду і могла передувати її впізнаванню ферментом. Таким чином, точний механізм розпізнавання залишається спірним, допоки не буде отримана просторова структура АлаРС у комплексі з тРНК<sup>Ала</sup>, де відбувається зв'язування з редагувальним доменом.

Хіральна селективність аміноацилювання за участі АлаРС не вивчалася, у літературних джерелах є лише відомості про аміноацилювання мініхеліксів L- та D-Ала за участі зв'язуючих олігонуклеотидів (рис. 1.9) [63, 64].



**Рис. 1.9.** Схематичне представлення положення L- та D-Ала щодо 3'-ОН групи мініхеліксу і метильної групи (CH<sub>3</sub>) тимідину. Стрілкою позначено нуклеофільну атаку 3'-О мінішпильки. Адаптовано з [30]

Отже, молекулярні механізми аміноацилювання та редагування АлаРС залишаються невідомими і потребують подальших досліджень.

#### **1.4. Стереоспецифічність амінокислот у процесі трансляції та роль D-амінокислот у про- та еукаріотичних організмах**

Повне хіральне переважання біологічних молекул проявляється у кожному організмі на Землі. На відміну від живих організмів, органічні матеріали у Всесвіті знаходяться у рацемічній суміші [65, 66]. У цьому контексті незалежна від організму суміш амінокислот, виявлена в метеориті Мерчісона (Murchison meteorite), продемонструвала, що аланін та ахіральний гліцин – найпростіші амінокислоти – мають найбільшу поширеність [67]. Більше того, молярне співвідношення енантіомерів L/D-Ала показало майже рівний розподіл 50/50 [68]. Гомохіральність амінокислот важлива для природнього біосинтезу білка, а в самих білках присутні лише L-енантіомери. Ймовірно, селективність щодо L-амінокислот визначалася стереохімією РНК [63].

Тим не менш, роль вільних D-амінокислот у бактерій та еукаріотів різноманітна: від їхньої участі в сигнальних шляхах [69-72] до побудови молекул пептидогліканів в клітинних стінках [73-75]. Варто зауважити, що клітинна концентрація L/D-стереоізомерів змінюється від нано- до мікромолярних в еукаріотів [76] і може досягати мілімолярних концентрацій у деяких прокариотів [77]. Цікаво, що мілімолярні рівні D-аланіну та D-глутамату, основних компонентів пептидогліканів клітинних стінок бактерій, перевищують рівні їхніх L-ізомерів [73]. У стінках бактерій D-амінокислоти сприяють стійкості до протеолітичного травлення/розщеплення [78]. Вони також можуть розглядатися як фактори, що гальмують ріст бактерій та перешкоджають утворенню біоплівки [79]. Крім того, D-амінокислоти були також виявлені у білках, отриманих з тканин людини під час старіння [80]. Цими білками були: базовий білок мієліну, білки еритроцитів та амілоїдні

пептиди мозку хворих Альцгеймера [81]. Показано, що D-амінокислоти мають токсичний вплив як на клітини прокаріотів, так і еукаріотів [82-85]. Нещодавно на клітинній лінії раку молочної залози було показано, що D-серин та D-аспартат є метаболітами пухлинних клітин, а рівні вільних D- та L-аспарагін можуть бути індикаторами розвитку раку [86].

Останні дані свідчать про те, що переважання одного енантіомеру амінокислоти може призвести до токсичності іншого [87]. Інтенсивне дослідження ролі D-амінокислот виявило ефективний механізм ферментативної рацемізації в архей, *Methanococcus maripaludis* [88], а також у дріжджах, *Schizosaccharomyces pombe* [89], що полягає в перетворенні D-аланіну в L-аланін та є нетиповим використанням D-енантіомеру в якості джерела Нітрогену. Таким чином, вільні D-амінокислоти в цитозолі клітин є потенційно важливими як для про-, так і еукаріотичної систем, незважаючи на те, що в біосинтезі білка використовуються лише L-амінокислоти.

Таким чином, гомохіральність амінокислот є важливою для функціонування апарату трансляції, в свою чергу D-амінокислоти виконують різні регуляторні функціональні фізіологічні ролі [90, 91]. Узагальнені дані щодо функціональної ролі D-амінокислот наведено в табл. 1.1.

Таблиця 1.1.

**Фізіологічна роль вільних D-амінокислот у різних організмів (за даними огляду [92])**

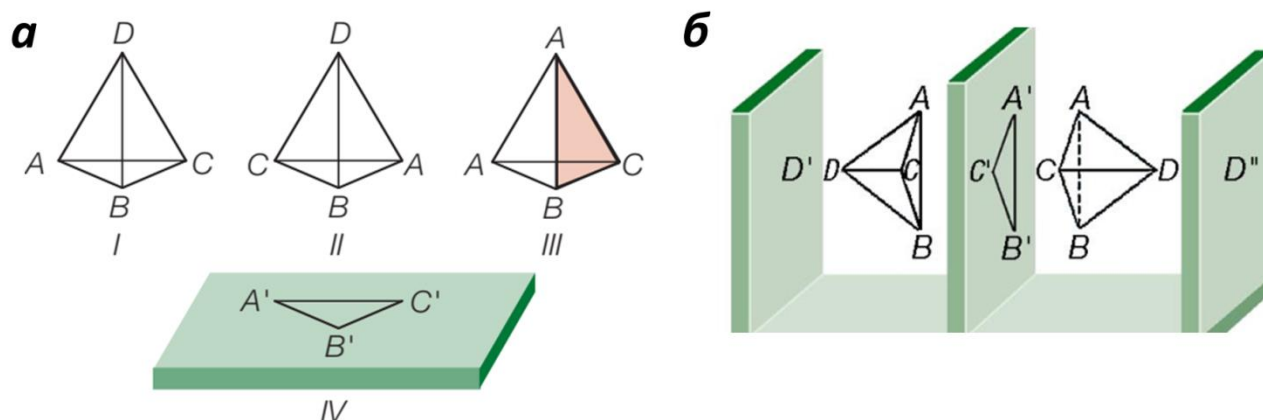
<b>Аміно-кислота</b>	<b>Організм</b>	<b>Функція</b>	<b>Посилання</b>
D-Ала, D-Сер, D-Асп, D-Асн, D-Глу, D-Глн	Бактерії	Клітинна стінка (компонент пептидогліканів)	[93]

D-Лей, D-Мет, D-Фен, D-Тир	Бактерії	Регуляція формування пептидогліканів	[75]
D-Лей, D-Вал, D-Фен	Бактерії	Частина Граміцидину та Граміцидину S	[94-97]
D-Мет, D-Лей	<i>S. aureus</i>	Інгібування біоплівки	[98]
D-Гіс	<i>S. aureus</i>	Стафілопін (металофор: метал-відлякуючий пептид)	[99]
D-Ала, D-Сер, D-Асп	Археї	Мембранно-зв'язані та у вільній формі	[100]
D-Ала	<i>Phyllomedusa sauvagei</i> (жаба)	Дерморфін (частина гептапептиду, що зв'язується з опіоїдними рецепторами)	[101, 102]
D-Мет	<i>P. sauvagei</i> (жаба)	Дельтропін (частина гептапептиду, що зв'язується з опіоїдними рецепторами)	[101, 102]
D-Трп	<i>Conus radiatus</i> (Равлик мисливський)	Контрифан (частина октапептиду; одна із складових отрути)	[103]
D-Цис	<i>Photuris lucicrescens</i> (Світлячок)	Складова D-люциферину (природній субстрат люциферази)	[78, 104]

D-2,3- діамінопропі онова кислота, D- Сер	<i>Bombyx mori</i> (Шовковичний шовкопряд)	Залучений у морфогенез	[78]
D-Ала	Водні Ракоподібні та двостулкові молюски	Залучений у підтримку клітинної осмолярності	[105]
D-Асп	Ссавці (нервова/ ендокринна/ репродуктивна системи)	Модулює NMDA рецептор, регулює секрецію таких гормонів як вазопресин, окситоцин, пролактин та тестостерон)	[106, 107]
D-Сер	Ссавці (мозок)	Ко-агоніст NMDA рецептора	[71, 108]
D-Сер	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Важливий для розвитку пилкової трубки	[109]

Здатність білків розрізняти оптичні ізомери є життєво важливою для життєдіяльності організмів та використовується в дизайні лікарських засобів. Відомі дві моделі, що можуть пояснити цю стереоспецифічність білків. Перша – модель триточкового приєднання ізомерної молекули (three-point attachment model) [110, 111], запропонована для ферментів та рецепторів фармакологічних сполук. У цій моделі, коли три групи (A, B і C) чотиригранного атома вуглецю зв'язуються з поверхнею білка у специфічних ділянках A', B' та C' (рис. 1.10. a, модифіковано з [112]), то неможливим є зв'язування еквівалентних A, B і C

груп його дзеркального зображення (енантіомера) в однакових трьох сайтах. Однак згодом було з'ясовано, що триточкова модель не є універсальною: якщо сайти зв'язування на білку знаходяться в щілині або на поверхні, що виступає, триточкове приєднання не буде достатнім для дискримінації ізомерів. А відтак вченими (Д. Кошландом і співаторами) було запропоновано чотириточкову локаційну модель, яка пояснює стереоселективність білків на прикладі ізоцитрат дегідрогенази (IDH), що ґрунтується на кристалографічних даних [112]. У цій моделі (рис. 1.10. б) групи  $A$ ,  $B$  і  $C$  різних ізомерів займають однакові місця на протеїні ( $A'$ ,  $B'$  та  $C'$ ), тоді як група  $D$ , орієнтована у різні сторони, взаємодіє з різними сайтами ( $D'$  і  $D''$ ), як це відбувається у сайті IDH.

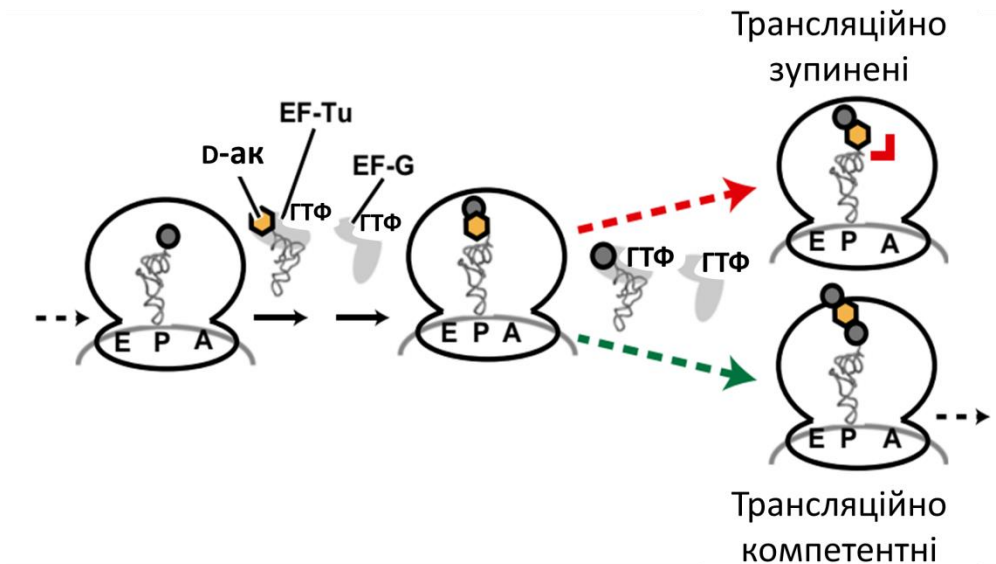


**Рис. 1.10.** (а) Оригінальна триточкова модель приєднання ліганду [110]. Ліганд зв'язується таким чином, що групи  $A$ ,  $B$ ,  $C$  одного енантіомеру (I) зв'язуються з ділянками  $A'$ ,  $B'$  and  $C'$  фермента відповідно. Видно, що інший енантіомер (II) не може отримати еквівалентний збіг груп  $A$ ,  $B$  і  $C$  з  $A'$ ,  $B'$  та  $C'$ . Якщо є дві групи  $A$  для отримання прохіральної молекули (III), модель може розрізняти дві однакові групи. Білкова поверхня, до якої зв'язуються хіральні молекули, показана на рис.1.10. а. IV. (б) Чотириточкова модель розташування, що демонструє як білок може забезпечувати наявність двох сайтів ( $D'$  and  $D''$ ) в будь-якому з двох сайтів взаємодії з групою  $D$  на хіральному атомі вуглецю:  $D'$  зв'язував би один енантіомер, а  $D''$  – зв'язував би його дзеркальне зображення [112]. Адаптовано з [112]

Згідно з таких розташуванням, для дискримінації стереоізомерів не є обов'язковою наявність чотирьох місць їхнього зв'язування з протеїном у випадку якщо фермент може зв'язувати ліганд тільки в одному напрямку. Хоча можуть бути випадки утворення чотирьох сайтів зв'язування «фермент-субстрат», що будуть визначати селективний відбір стереоізомеру субстрату. Таким чином, чотирьохлокаційна модель є цілком логічною для пояснення феномену дискримінації ферментами L- та D-енантіомерів амінокислот.

Хіральна дискримінація амінокислот є важливою для двох пов'язаних стадій біосинтезу білка, аміноацилювання та формування пептидних зв'язків [113]. Перший процес каталізується АРСазами, ферментами, які володіють специфічністю у розпізнаванні L-амінокислот і приєднують їх до споріднених тРНК [8]. Враховуючи, що рівень активації і зв'язування D-амінокислот з тРНК є досить низьким, а первинні тести, проведені для ВалРС, ІлеРС, МетРС, ЛейРС [9], АспРС [10] та ФенРС [114], показали незначну кількість утворення D-аміноацил-аденілатів для D-Вал/D-Іле/D-Мет/D-Лей/D-Фен відповідно (менше 1%), ймовірність формування таких комплексів з тРНК є дуже низькою. Що стосується пептидил-трансферазного центру рибосоми, то дискримінація хіральності амінокислот там не є абсолютною. Спочатку М. Енгландером та співавторами було показано, що клітинний апарат трансляції може ефективно, хоча й повільно, приймати D-аміноацил-тРНК в рибосомальний А-сайт, використовуючи його в якості акцептора для перенесення пептидильного залишку з Р-сайту, в результаті переносити пептидил-D-аміноацил-тРНК в пептидил-тРНК-зв'язувальний (Р) сайт рибосоми [115]. Після кількох циклів елонгації трансляції, субпопуляція рибосом з пептидил-D-аміноацил-тРНК в Р-сайті починає виступати в якості донора для перенесення пептидилу і таким чином може спричиняти зупинку трансляції (рис. 1.11). Інша субпопуляція рибосом з пептидил-D-аміноацил-тРНК на етапі елонгації може продовжувати трансляцію, якщо після D-амінокислоти приєднується L-ізомер, що робить можливим включення D-амінокислот в повнорозмірні білки клітинним апаратом трансляції, в якому відсутня ДТД. Таким чином, дослідниками було

показано, що на С-кінці зростаючого поліпептидного ланцюга можуть відбуватися конформаційні зміни всередині рибосоми у разі приєднання пептидил-D-аміноацил-тРНК, що стабілізує стан пептидил-трансферазного центру (РТС) у неактивній конформації.



**Рис. 1.11.** Схема розподілу елонгаційних комплексів, що переносять пептидил-D-аміноацил-тРНК, на трансляційно зупинені та трансляційно компетентні субпопуляції. Адаптовано з [115]

У подальших роботах цієї групи вчених на чолі з Р. Гонсалезом, з'ясувалося, що D-аміноацил-опосередкована зупинка трансляції модулюється ідендичністю вхідного комплексу D-аміноацил-тРНК [116]. Їхнє відкриття показало, що саме спарювання донора пептидил-D-аміноацил-тРНК та акцептора аміноацил-тРНК визначає активність РТС. А отже, відношення трансляційно зупинених та компетентних субпопуляцій елонгаційних комплексів визначається ідендичністю бічного радикала D-амінокислот, що відкриває нові можливості для білкової інженерії.



## 1.5. Процес контролю якості біосинтезу білка

Під контролем якості біосинтезу білка розглядають сукупність факторів, що регулюють точність трансляції, та їх механізми селективного відбору споріднених та неспоріднених субстратів. Машинерія біосинтезу білка включає кілька етапів для контролю його якості. Першою контрольним пунктом є активний сайт АРСаз (відомий як *цис*-редагувальний фактор) в розпізнаванні та утворенні однорідної пари амінокислота-тРНК [117-119]. Оскільки неспоріднені амінокислоти також розпізнаються та можуть активуватися АРСазами, другою контрольною точкою є внутрішній механізм редагування за участі АРСаз. Деякі АРСази мають редагувальну активність для виправлення власних помилок [120]. Ці корегувальні механізми вилучають помилкові амінокислоти двома шляхами: гідролізом помилково утворених проміжних продуктів – аміноацил-аденілатів (претрансферне редагування) та/або деацилюванням помилково заряджених тРНК (посттрансферне редагування) [121]. Крім того, існують *транс*-редагувальні фактори, такі як AlaX (закодовані в геномі білки, які є гомологами редагувального домену АлаРС) [29, 58, 122, 123], YbaK (вільнодоступний однодоменний редагувальний білок ПроРС) [124-126], ДТД (D-аміноацил-тРНК деацилаза, фермент, здатний гідролізувати кілька різних D-аміноацил-тРНК) [3, 81, 127-131]. Четвертим контрольним пунктом трансляції є дискримінація неспоріднених субстратів фактором елонгації Tu (EF-Tu) [132, 133] у бактерій та eEF-1A в архей та еукаріотів. Останнім, але не найменш важливим, є клітинний етап контролю помилкової трансляції, а саме – дискримінація рибосоמוю неприродних амінокислот [115, 134] та правильне сполучення кодон-антикодон у центрі декодування рибосоми [135]. На рис. 1.12 показано схему стереоспецифічного контролю на етапі трансляції. Апарат трансляції, що включає АРСази, EF-Tu та рибосому надає перевагу L-амінокислотам та L-аміноацил-тРНК, однак є так само проникним і для D-амінокислот та D-аміноацил-тРНК. ДТД спеціально відокремлює D-аміноацил-



критично низькою і становити 1:3 [138]. Через брак специфічності, ТирРС легко аміноацилює тРНК<sup>Тир</sup> за участі D-Тир і L-Тир. Спочатку це явище досліджувалося лише для ТирРС *E.coli* та *Bacillus subtilis* [2, 3, 44, 138-140], пізніше метаболізм та утворення D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> було показано для ціанобактерій [130] та для еукаріотів у *Saccharomyces cerevisiae* [39]. Для вирішення проблеми найслабшої специфічності ТирРС серед АРСаз в розпізнаванні амінокислотних енантіомерів було проведено кілька експериментів зі вставкою домену для посттрансферного редагування ФенРС [141, 142]. Було показано, що домен ФенРС є стереоспецифічним, тому його додавання до ТирРС може перенаправити її енантіоселективність на гідроліз, специфічний до L-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> [143]. Крім того, щонайменше один варіант ТирРС-ФенРС<sub>ред</sub> (F145A/S211A), який має гіперактивний редагувальний домен, демонстрував зворотний ефект зміни стереоспецифічності ТирРС [144], переважно аміноацилюючи тРНК<sup>Тир</sup> з D-Тир.

Останніми роками інтерес до вивчення механізмів редагування за участі АРСаз, які забезпечують точність трансляції, привертають підвищену увагу дослідників. Нещодавно, використовуючи комбінацію біохімічного та обчислювального підходів, для кількох АРСаз, включаючи ФенРС [145, 146], ПроРС [147, 148], ЛейРС [149, 150] та архейну ТреРС [151, 152], були запропоновані механізми тРНК-асистованого редагування. Більшість запропонованих механізмів свідчать про пряму роль 2'-ОН або 3'-ОН груп А76 тРНК в активації нуклеофільної молекули води, що ініціює гідролітичну реакцію. Слід зазначити, що розрахунки, засновані на гібридному підході поєднання квантової та молекулярної механіки (QM/MM), використаному у попередніх роботах [146, 147, 149, 152], обмежувалися скануванням потенційної енергії поверхні теоретично запропонованих механізмів реакції. Альтернативний тРНК-асистований механізм був показаний з використанням методів квантової хімії (QM) для каталізу гідролітичної реакції за участі проліл-тРНК синтетази бактеріального типу [148].

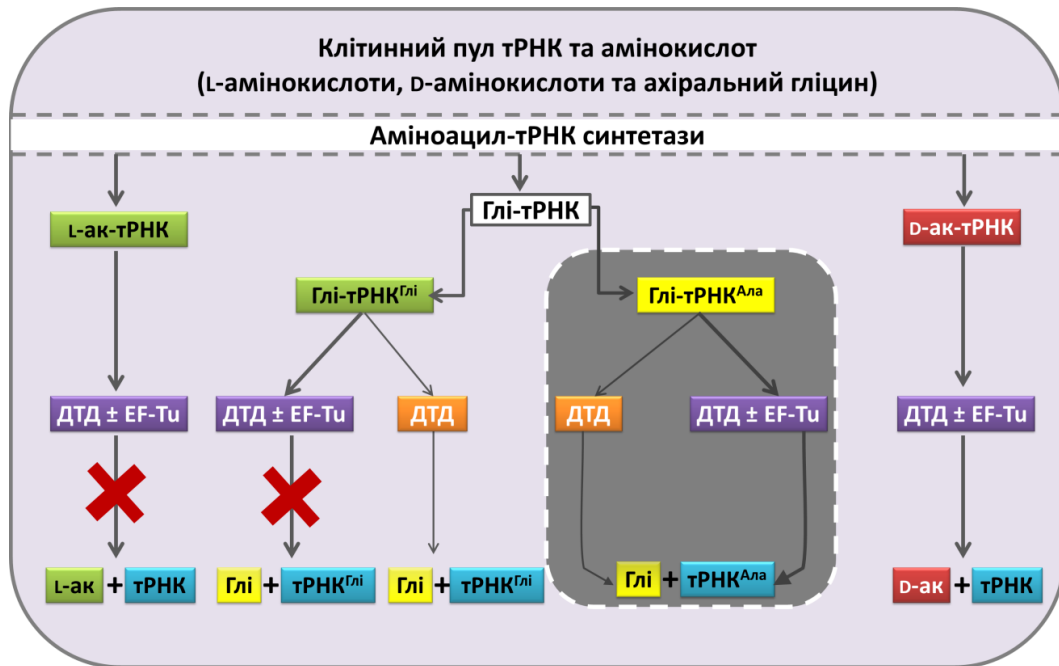
Однак в літературних джерелах поки що немає даних щодо залучення редагувальних доменів APCаз до стереоспецифічного контролю, а відтак це питання було досліджено в нашій роботі.

### **1.6. Роль D-аміноацил-тРНК-деацилази у забезпеченні стереоспецифічної селекції амінокислот у процесі біосинтезу білка**

D-аміноацил-тРНК-деацилаза (ДТД, ЕС 3.1.1.96) – фермент, що руйнує комплекси D-аміноацил-тРНК, гідролізуючи складноєфірний зв'язок між D-амінокислотою та тРНК. Цей ензим має широку специфічність [130], а тому може від'єднувати різні D-аміноацильовані групи, як-от, D-Тир, D-Трп, D-Асп і D-Фен [3, 39], запобігаючи включенню D-амінокислот у синтезовані білки. Перше спостереження редагувальної активності деацилази в екстрактах *E. coli*, *S. cerevisiae*, ретикулоцитах кролика та печінці щурів було повідомлено Р. Календаром та П. Бергом у 1967 році [3]. Пізніше Дж. Сутуріна зі співавторами очистили *E. coli* ДТД [39, 153] та *S. cerevisiae* ДТД [39, 154]. Рослинна ДТД була відкрита як продукт експресії гена GEK1, який бере участь у толерантності до етанолу в *Arabidopsis thaliana* [129]. Ідентифікація ДТД в інших групах організмів, включаючи людину [131], підтверджує її широке розповсюдження у всіх царствах живої природи і може розглядатися в якості важливого контрольного етапу забезпечення специфічності під час трансляції. Крім того, первинна послідовність амінокислот ДТД серед прокариотів та еукаріотів відрізняється високою консервативністю [127, 155], що свідчить про сталість функції ферменту для всіх живих організмів.

Нещодавні дослідження свідчать, що деацилаза також відіграє ключову клітинну роль у редагуванні тРНК<sup>Ала</sup>, помилково аміноацильованих ахіральним Глі [156]. Варто зазначити, що Глі-тРНК<sup>Глі</sup> впізнаються за допомогою ДТД, але EF-Tu забезпечує захист споріднених субстратів Глі-тРНК<sup>Глі</sup> від їхнього помилкового редагування, в той час як помилково ацильовані Глі-тРНК<sup>Ала</sup> ефективно гідролізуються навіть у присутності EF-Tu (рис. 1.13.). До того ж

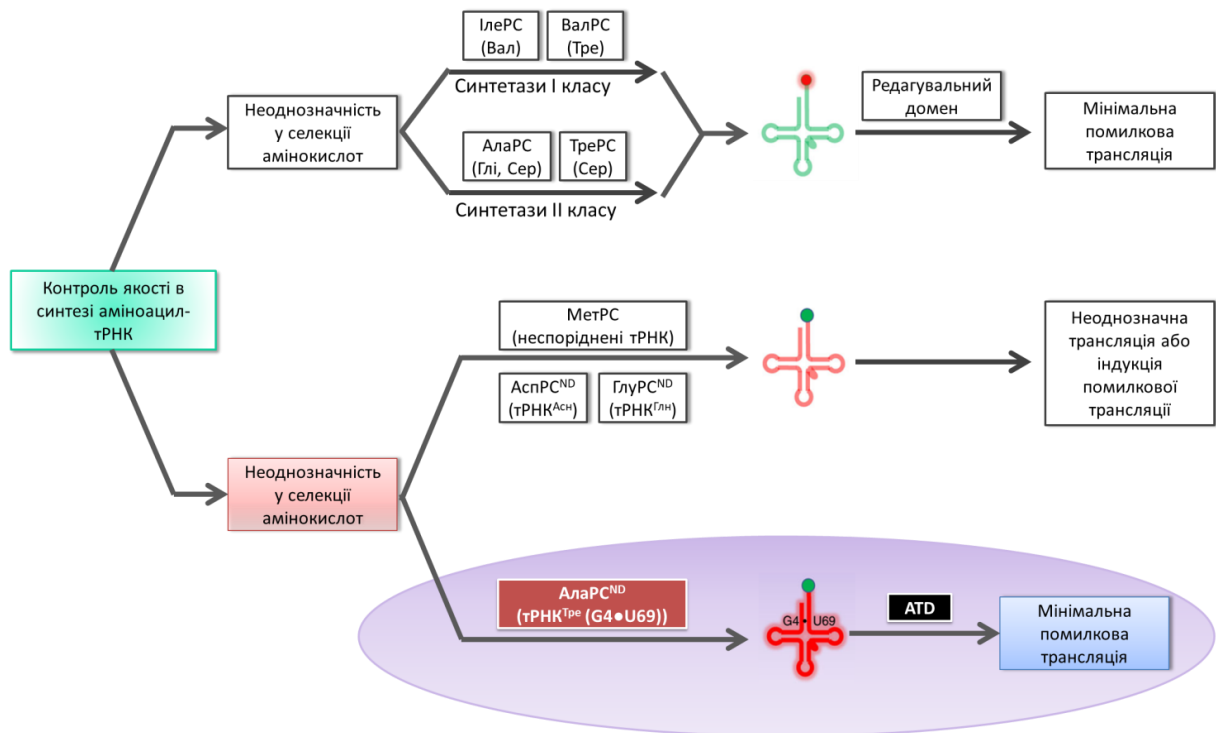
цей фермент почали розглядати як нову антимікробну та протипаразитарну мішень [4]. Тим не менш, механізм гідролізу за допомогою ДТД залишався донедавна незрозумілим. Наше нещодавнє дослідження підтвердило роль *цис*-діольних ОН груп кінцевого А76 тРНК<sup>Тир</sup> у деацилюванні D-Тир-аміноацил-тРНК<sup>Тир</sup> за участі *транс*-редагувального фактора ДТД з *Thermus thermophilus* [157].



**Рис. 1.13.** Роль ДТД як ключового фактора для від'єднання гліцину, помилково приєнаного до тРНК<sup>Ала</sup>. Товстими з'єднувальними стрілками вказано на клітинний сценарій, в якому присутні як ДТД, так і EF-Tu. Адаптовано з [156]

В ході досліджень ДТД було ідентифіковано три класи деацилаз: клас ДТД-1 (DTD1) був виявлений у більшості бактерій та всіх еукаріотів [153], клас ДТД-2 (DTD2) був відкритий у архей та рослин [128, 129], клас ДТД-3 (DTD3) – у більшості ціанобактерій [130]. Види з ДТД-1 мають ортологічні гени *yihZ* та *dtd*, відповідальні за активність деацилази. Незважаючи на те, що гомологи *dtd* були знайдені в різних про- та еукаріотичних геномах, в архей та згодом у рослинах був ідентифікований інший тип ДТД (*dtd2*). На відміну від переважно

димерних білків ДТД-1, ДТД-2 має мономерну структуру. Крім того, активність деацилаз другого класу залежить від наявності іонів  $Zn^{2+}$ . В свою чергу третій тип D-аміноацил-тРНК-деацилаз кодується геном *dtd3* (гомологічним *dtd1*). ДТД-3 – це металофермент з двома активними ділянками зв'язування іонів металів: перший зв'язує лише  $Zn^{2+}$ , другий – іони  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  та  $Co^{2+}$ . Окрім вищезазначених класів ДТД, дослідниками нещодавно було ідентифіковано новий тип АТД (**A**nimalia-specific **t**RNA-**d**eacylase), що на відміну від усіх інших ДТД містить енантіоселективний мотив у *транс*-конформації (Gly-*trans*-Pro замість Gly-*cis*-Pro) [158]. Ця структурна особливість АТД дає можливість цьому ферменту гідролізувати помилково ацильовані субстрати L-Ала-тРНК<sup>Тре</sup> (G4•U69) (рис. 1.14).



**Рис. 1.14.** Участь АТД, унікального редагувального фактора, у виправленні критичних помилок відбору тРНК за участі АРСаз. Модель помилкового відбору та послідовного помилкового ацилювання тРНК<sup>Тре</sup> (G4•U69) L-аланіном за участі АлаРС<sup>ND</sup> та подальше редагування за участі АТД. Споріднені та неспоріднені тРНК забарвлені зеленим та червоним кольорами відповідно; споріднені/неспоріднені амінокислоти позначено аналогічно. Адаптовано з [158]

Були проведені деякі функціональні дослідження ДТД з *E. coli* [153], *S. cerevisiae* [39, 154], архебактерій [128], але глибокі структурні дослідження, які можуть пояснити механізм гідролізу D-аміноацил-тРНК за участі ДТД, дотепер не повідомлялися. М.-Л. Феррі-Фіоні та іншими було представлено першу кристалічну структуру ДТД з *E. coli* [127, 153] та проаналізовано метаболізм D-Тир-тРНК у *E. coli* та *Saccharomyces cerevisiae* [39, 154]. Пізніше Lim та його колеги намагалися пояснити каталітичний механізм гідролізу за участі ДТД на основі кристалічної структури апо-фермента *Haemophilus influenzae* ДТД на доповнення до моделі комплексу фермента/D-Тир-тРНК [155]. Вони запропонували субстрат-асистований механізм деацилювання з непротонованою аміногрупою D-тирозиною. Для нового класу ДТД, знайденого у архей [128, 159] та ціанобактерій [129], також не було описано механізму гідролізу помилкових аміноацил-тРНК.

Нещодавно було здійснено другу спробу характеристики ДТД-механізму за допомогою *Plasmodium falciparum* ДТД; було успішно отримано її кристалічну структуру в комплексі з аналогом субстрату [133, 160, 161]. Крім того, було оголошено про потенційну роль тРНК у гідролітичній реакції. Усі попередні дослідження гідролізу, каталізованого ДТД, підтверджують гіпотезу каталізу на користь тРНК-асистованого. На жаль, не було запропоновано детального механізму з переконливою експериментальною валідацією [160]. Більше того, незважаючи на тривалі та інтенсивні експериментальні та теоретичні дослідження кінетики та механізмів реакції гідролізу ефірів, деталі цих процесів все ще є предметом дискусії, навіть щодо гідролізу простих естерів у нейтральних водних розчинах (наприклад, [162]).

В ході нашої роботи було змодельовано D-Тир-аміноацил-тРНК<sup>Тир</sup> у комплексі з ДТД *T. thermophilus* та виконано комплексні дослідження з використанням сайт-спрямованого мутагенезу залишків запропонованого активного сайту. Паралельно структуру перехідного стану та деталі каталітичного механізму було визначено за допомогою симуляцій молекулярної динаміки (МД) та QM обчислень. Біохімічні тестування активності ДТДТТ

стосовно субстратів A76/2'd/3'd-тРНК<sup>Тир</sup> підтвердили важливість обох гідроксильних груп тРНК<sup>Тир</sup> для гідролізу D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> [157]. Експериментальні та розрахункові дослідження підтвердили субстрат-асистований механізм гідролізу за участі ДТД [163].



## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали та обладнання

Усі використані реагенти відповідали вимогам, прийнятим для застосованих методів.

У роботі були використані такі реактиви: компоненти середовищ для бактеріальних культур («Difco», США), реактиви і колонки для виділення плазмідної ДНК («Macherey-Nagel», США, Німеччина), TOPO TA-cloning kit («Invitrogen», США), реактиви для виділення ДНК з гелю Nucleospin-Extract II («Macherey-Nagel», США, Німеччина), ДСН (додецил сульфат натрію), персульфат амонію («Bio-Rad», США), Tris («Sigma», США), ДТТ («Bio-Rad», США), ампіцилін, канаміцин та хлорамфенікол («Euromedex», Франція), кумасі діамантовий синій G-250, акриламід, ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота), TEMED (тетраметилетилендіамін) («Serva», Німеччина), мономери ПААГ («Sigma», США), амінокислоти («Pierce», США), ПЕІ-целюлоза («Merck», Німеччина), а також фосфодіестераза («Worthington», США), радіоактивно мічені речовини («Amersham» та «PerkinElmer», США), скловолоконні фільтри («Whatman», США), DEAE Toyopearl 650M («ToyoSoda» (Японія), Ni-NTA-Sepharose Fast Flow («GE Healthcare»), хроматографічна колонка ProSwift Monolith WAX-1S («Dionex», США), гель-фільтраційна колонка Superdex 200 («Pharmacia», Швеція). Решта реактивів (в т.ч. солей та інших компонентів буферних розчинів) кваліфікації «о.с.ч.» і «ч.д.а.» (вітчизняного виробництва). Всі буферні розчини готували на основі води надвисокої очистки, отриманої за допомогою системи очистки води «Milipore» (США). Контроль рівню рН проводили за участі рН-метра компанії «Mettler Toledo» (США).

Використані в роботі генноінженерні конструкції дикого типу тРНК<sup>Тир</sup> та тРНК<sup>Ала</sup>, АлаРС з 6<sup>x</sup>-Гіс-тагом *T.thermophilus*, а також препарат ТирРС *T.thermophilus* були надані співробітниками відділу ензимології білкового синтезу. Штами клітин *Escherichia coli* BL21(DE3)Star, BL21(DE3)pLysS і Top10: Top10 (F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-) та BL21 (DE3) Star (F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3)) фірми «Invitrogen» («Life Technologies», USA). Синтез праймерів для сайт-спрямованого мутагенезу ДТДТТ проводився співробітниками компанії «Invitrogen».

Робота проводилась з використанням центрифуги «Centrifuge Jouan MR 1411», «MR 23i» («ThermoElectron Corporation»), 5810R («Eppendorf»), рН-метру («Mettler Toledo», США), ламінарного боксу, термостату «Binder», «Термит» та Biosan Ultratherm BWT-U, спектрофотометру NanoDrop («Thermo Scientific») та BioSpectrometer (Eppendorf, Німеччина). Крім того були використані в дослідженнях: ампліфікатор Techgene та GeneAmp PCR System 2400 («Applied Biosystems», США), термостатовані шейкери Biosan ES-20, Thermo MaxQ 4000, ультразвуковий дезінтегратор Misonix Sonicator Ultrasonic Processor XL, прилад для вертикального електрофорезу Hoefer SE250, насос LKB Microperplex 2132, колектор фракцій LKB Redirac 2112, холодний бокс Colora Cold Box Nr.481081, система для HPLC хроматографії “UltiMate 3000” («DIONEX», Німеччина), сцинтиляційні лічильники Perkin Elmer Tri-Carb 2800TR (США) та Hidex 600 SL (Фінляндія), система PharosFX™ Plus System та QuantityOne software («BioRad», США).

Всі експерименти проводилися з використанням високочистого скляного та стерильного пластикового посуду, наконечників одноразового використання («Deltalab», Іспанія) та автоматичних піпеток фірм «Eppendorf» та «Gilson».

## 2.2. Методи роботи з клітинами *Escherichia coli*

### 2.2.1. Поживні середовища для росту бактеріальних клітин.

Середовище Лурія-Бертані (LB) (10% триптон, 5% дріжджовий екстракт («Difco», США), 10% NaCl («Helicon», Росія)) використовували для нарощування культур для виділення плазмідних ДНК. Аналіз рівня експресії ДТД проводили в середовищі LB, ТВ (Terrific-Broth) (12% триптон, 24% дріжджового екстракту, 2,5% гліцерин, 2,31%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  та 12,54%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  («Helicon», Росія), Р (фосфатне середовище) (10% дріжджовий екстракт, 20% глюкоза («Helicon», Російська Федерація), 5,6%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  та 28,9%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 2xTY (16% триптон, 10% дріжджовий екстракт, 5% NaCl). Всі середовища стерилізували автоклавуванням при 1.5 атм протягом 40 хв. Середовище SOC для отримання електрокомпетентних клітин *E. coli* містило 50% NaCl, 19% KCl, 2% триптон, 0,5% дріжджовий екстракт, 0,095%  $\text{MgCl}_2$ , 0,12%  $\text{MgSO}_4$ . Антибіотики додавали зі стокових розчинів з концентраціями 100 мг/мл для ампіциліну, 50 мг/мл – для канаміцину, 35 мг/мл – для хлорамфеніколу. Робочі концентрації становили 100 мкг/мл, 50 мкг/мл та 35 мкг/мл відповідно.

**2.2.2. Отримання електрокомпетентних клітин *E. coli*.** В ході роботи використовували електрокомпетентні клітини *E. coli* штамів BL21(DE3)Star, BL21(DE3)pLysS і Top10. В 100 мл LB інокулювали 2 мл культури *E. coli*, вирощеної без антибіотиків протягом 16 год за температури 37 °С, дорощували її на шейкері за 37 °С до  $\text{OD}_{600} = 0.6$  о.од. Охолоджували 15 хв на льоду. Клітини осаджували центрифугуванням за температури 4 °С протягом 15 хв за 6000 об/хв, видаляли надосадову рідину. Осад ресуспендували в 100 мл 10% холодного гліцерину. Центрифугували за тих же умов, видаляли надосадову рідину. Після цього осад ресуспендували в 50 мл холодного 10% гліцерину, осаджували за тих же умов, видаляли надосадову рідину. Осад ресуспендували в 4 мл 10% холодного гліцерину, центрифугували за тих же умов, видаляли надосадову рідину. Отриманий осад клітин ресуспендували у 300 мкл 10%

гліцерину, вносили по 40 мкл клітин у мікропробірку, зберігаючи за температури  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**2.2.3. Трансформація клітин *E. coli* методом електропорації.** У розморожену на льоду фасовку електрокомпетентних клітин вносили 0,5-2 мкл розчину плазмідної ДНК в низькосольовому розчині (10мМ Тріс-НСІ, рН 8.0), перемішуючи. Суспензію клітин переносили в попередньо охолоджену до  $0-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  кювету для електропорації, пропускали через неї імпульс ( $\sim 1.7-1.8\text{ кВ}$ ) в електропораторі MicroPulser 165-2100 («Bio-Rad», США). Потім вносили в кювету 200 мкл SOC, клітини з SOC відбирали в стерильну мікропробірку, інкубували протягом 20-60 хв за температури  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  на шейкері при 220 об/хв. Висівали на чашку Петрі з відповідним антибіотиком, інкубуючи протягом ночі при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**2.2.4. Отримання біомаси *E. coli* для індукції експресії рекомбінантних білків.** З чашки Петрі відбирали поодинокую колонію, інокулювали в 10-50 мл відповідного поживного середовища з антибіотиком, нарощуючи 16-18 год при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Після цього в попередньо нагріте до  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  середовище з антибіотиком вносили  $1/50$  обсягу нічної культури. Нарощування продовжували до до  $\text{OD}_{600} = 0.5-0.6$  о.од. Індукцію експресії рекомбінантних білків проводили ізопропіл- $\beta$ -D-1-тіогалактопіранозідом (IPTG) за визначених оптимальних концентрацій та продовжували інкубацію ще кілька годин. Після закінчення часу індукції біомасу клітин осаджували центрифугуванням при  $4000\text{ g}$  ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) протягом 30 хв та заморожували на  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 2.3. Методи роботи з нуклеїновими кислотами

**2.3.1. Дизайн олігонуклеотидів.** Послідовності олігонуклеотидів для клонування ДТД, її сайт-спрямованого мутагенезу підбирали на основі даних послідовностей гена, отриманих із GenBank (NCBI). Температури плавлення розраховували за допомогою онлайн-програм Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) та  $T_m$

calculator (<https://www.thermofisher.com>). Олігонуклеотиди для сайт-спрямованого мутагенезу ДТДТТ були комплементарними одній і тій же ділянці гена і мали послідовність з 30-45 нуклеотидів із відсотком G-C пар не меншим 40%. Решту параметрів праймерів підбирали за рекомендаціями виробника за методом QuickChange (Stratagene).

### 2.3.2. Ампліфікація ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції.

Полімеразну ланцюгову реакцію застосовували для клонування гену ДТД та сайт-спрямованого мутагенезу. У першому випадку застосовували Taq ДНК-полімеразу («Stratagene», США), а для мутагенезу – високоточну Pfu-turbo полімеразу («Stratagene», США). Для клонування геномну ДНК з клітин *T. thermophilus* отримували згідно [164]. На основі інформації про послідовності гена ДТД від *Thermus thermophilus* (152 амінокислотних залишків) (GenBank: WP\_011173028.1) було розроблено два праймери для ПЛР DtyrTT-N (5'- CCA TGG CGG GCG GTG GTG CAG CGG GTC TCC) та DtyrTT-C (5'-AAG CTT ATT AGC GTG GGC GG AAG CGT TCC TCC TCG GAG TCC). Ділянки рестрикції NcoI та Hind III були включені відповідно до прямого та зворотного праймерів відповідно. Попередньо праймери фосфорилували за допомогою 10 одиниць (U) T4-полінуклеотидкінази («Thermo Scientific», Литва) у суміші, що містила 200 пмоль праймера, 50 мМ Тріс-НСІ (рН 7.5), 5 мМ ДТТ («Euromedex», Франція), 0,1 мМ АТФ («Sigma», США), 10 мМ MgCl<sub>2</sub> («Sigma», США) протягом 1 години при 37 °С з подальшою інактивацією кінази протягом 20 хв при 65 °С.

Ампліфікацію гена ДТД проводили наступним чином: денатурація – 1 хв, 94 °С; відпал – 1 хв, 50 °С; подовження – 1 хв, 72 °С (всього – 30 циклів) у 50 мМ Тріс-НСІ (рН 9,0), 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ сульфату амонію («Merck», Німеччина), 1 мкл геномної ДНК, 0,2 мМ dNTP («Sigma», США), 40 пмоль кожного праймера і 2,5 одиниць (u) Taq ДНК-полімерази («Stratagene», США). Був отриманий фрагмент ПЛР розміром 460 п.о., котрий далі клонували у вектор pCRII-ТОРО («Invitrogen», США), використовуючи для цього комплект для ПЛР Zero-Blunt-ТОРО («Life Technologies», США). Для трансформації

використовували електрокомпетентні клітини *E.coli* Top10 («Invitrogen», США). Наявність позитивних клонів підтверджували після виділення плазмідної ДНК за допомогою GeneJET Plasmid Miniprep Kit («Thermo Scientific», Литва).

**2.3.3. Сайт-спрямований мутагенез.** Сайт-спрямований мутагенез проводили за протоколом Stratagene (QuickChange<sup>®</sup> mutagenesis kit) з використанням Pfu-turbo ДНК-полімерази. Реакційна суміш містила: Pfu-turbo (2,5 U/мкл), 1x реакційний буфер (Stratagene), суміш дНТФ, матричну плазмиду pUC18 та пару праймерів, підбрану для отримання окремої мутантної форми ДТД. ПЛР-реакція проходила у 12 циклів за схемою: денатурація за температури 95 °С, 30 секунд; відпал за температури 55 °С, 1 хв; елонгація 68 °С, 2 хв 42 с). Матриця була оброблена рестриктазою Dpn I (10 U/мкл), що впізнає метильовані сайти Gm6A<sup>^</sup>TC, протягом 3 год за температури 37 °С. Новоутворена пДНК з мутацією трансформувалася у бактеріальні компетентні клітини *E. coli* штаму Top10. Трансформовані клітини висівали на середовище з антибіотиком та відбирали 10 окремих колоній з наступним нарощуванням та отриманням плазмідних ДНК. Наявність і цілісність отриманої генної конструкції перевіряли рестрикційним аналізом, що підтверджувався секвенуванням за допомогою праймерів DTT-S1 (GGTGCTCCTGGTCAGCCAGTTCACCCCTTA) та M13pUC Reverse (AGCGGATAACAATTTTCACACAGG) в групі секвенування ІМБГ. Перелік праймерів, що використовувався для сайт-спрямованого мутагенезу гену ДТД наведений у табл. 2.1.

**Перелік праймерів для сайт-спрямованого мутагенезу гену ДТД  
(синтезований Invitrogen™)**

Мутантна форма ДТД	Forward primer sequence (5'→ 3') Послідовність праймерів вперед (5'→ 3')	Reverse primer sequence (5'→ 3') Зворотна послідовність праймерів (5'→ 3')
S77A	<i>DTt S77A.1</i> GGTGCTCCTGGTCGCCAGTTCAC CCTTTACG	<i>DTt S77A.2</i> CGTAAAGGGTGAAC TGGGCGAC CAGGAGCACC
Q78A	<i>DTt Q78A.1</i> GGTGCTCCTGGTCAGCGCGTTCAC CCTTTACGCCG	<i>DTt Q78A.2</i> CGGCGTAAAGGGTGAACGCGCT GACCAGGAGCACC
F79A	<i>DTt F79A.1</i> GCTCCTGGTCAGCCAGGCCACCC TTTACGCCG	<i>DTt F79A.2</i> CGGCGTAAAGGGTGGCCTGGCT GACCAGGAGC
V124A	<i>DTt V124A.1</i> GTGGAAACCGGGGCTTACGGGGC CCAC	<i>DTt V124A.2</i> GTGGGCCCCGTAAGCCCCGGTTT CCAC
Y125A	<i>DTt Y125A.1</i> GGAAACCGGGGTTGCCGGGGCCC ACATGC	<i>DTt Y125A.2</i> GCATGTGGGCCCCGGCAACCCCG GTTTCC
Y125F	<i>DTt Y125F.1</i> GGAAACCGGGGTTTTTCGGGGCCC ACATGC	<i>DTt Y125F.2</i> GCATGTGGGCCCCGAAAACCC GGTTTCC
A127M	<i>DTt A127M.1</i> GGAAACCGGGGTTTACGGGATGC ACATGCGGGTCCACCTGG	<i>DTt A127M.2</i> CCAGGTGGACCCGCATGTGCATC CCGTAAACCCCGGTTTCC
A127V	<i>DTt A127V.1</i> GGAAACCGGGGTTTACGGGGTCC ACATGCGGGTCCACCTGG	<i>DTt A127V.2</i> CCAGGTGGACCCGCATGTGGACC CCGTAAACCCCGGTTTCC
G137A	<i>DTt G137A.1</i> CCACCTGGTGAACGATGCCCCCG TCACCCTCTTCC	<i>DTt G137A.2</i> GGAAGAGGGTGACGGGGGCATC GTTACCAGGTGG

P138A	<i>DTt P138A.1</i> CCTGGTGAACGATGGCGCCGTCA CCCTCTTCCTG	<i>DTt P138A.2</i> CAGGAAGAGGGTGACGGCGCCA TCGTTCACCAGG
P138H	<i>DTt P138H.1</i> CCTGGTGAACGATGGCCACGTCA CCCTCTTCCTG	<i>DTt P138H.2</i> CAGGAAGAGGGTGACGTGGCCA TCGTTCACCAGG
V139A	<i>DTt V139A.1</i> GTGAACGATGGCCCCGCCACCCT CTTCCTGGAC	<i>DTt V139A.2</i> GTCCAGGAAGAGGGTGGCGGGG CCATCGTTCAC

**2.3.4. Рестрикція та лігування фрагментів ДНК.** В роботі використовувалася ендонуклеази рестрикції виробництва («Thermo Scientific», Литва). Рестрикція проводилася у відповідному буфері Fast Digest Buffer цієї системи для ферментів MvaI (для конструкції РНК<sup>Тир</sup>), NcoI та Hind III Fast Digest (для ДТДТТ): для аналітичних умов – 2<sup>x</sup> або 1<sup>x</sup> Tango, для препаративних – у буфері R. 1 мкг ДНК оброблялися 1.5 од ендонуклеази рестрикції в об'ємі 20 мкл. Реакційна суміш інкубувалася при 37 °С 3-4 год, ДНК фрагменти аналізувалися методом ДНК електрофорезу в агарозному гелі.

Позитивні клони (після ПЛР гена ДТДТТ) були ідентифіковані за допомогою рестриктаз NcoI та HindIII. Правильна послідовність гена ДТДТТ була підтверджена секвенуванням ДНК. Після цього ген ДТДТТ обробляли рестриктазами NcoI та Hind III Fast Digest («Thermo Scientific», Литва) і лігували з вектором pProEXHTb (EMBL, Франція), попередньо дефосфорильованим 1 одиницею (u) фосфатази креветок (shrimp phosphatase) в 1x реакційному буфері («Roche», Швейцарія). 1 одиницю (u) T4-ДНК-лігази в 1x лігазному буфері («Thermo Scientific», Литва) з додаванням 1 мМ спермідину («Sigma», США) та 1 мМ АТФ (протягом 20 год при 14 °С) використовували для лігування. Клітини *E. coli* Top10 трансформували сумішшю для лігування за допомогою системи електропорації «Bio-Rad» (США).



### 2.3.5. Очистка плазмідної ДНК та електрофоретичне розділення її фрагментів.

**2.3.5.1. Виділення плазмідної ДНК за допомогою GeneJET Miniprep Kit.** Культуру клітин, вирощену на селективному середовищі, осаджували за 4000 об/хв протягом 5 хв. Надосадову рідину видаляли, клітини додатково центрифугували. Суспендували клітини в 250 мкл буферної суміші (50 мМ Трис-НСІ (рН 8.0), 10 мМ ЕДТА, 100 мкг/мл РНКаза А). Додавали 250 мкл лізуючої буферної суміші (1% SDS, 200 мМ NaOH), перемішували, інкубували впродовж 5 хв за кімнатної температури. Додавали 350 мкл нейтралізуючої буферної суміші (3 М  $K^+$ , 5 М  $Ac^-$ , рН 4,5), перемішували, центрифугували протягом 10 хв за 13000 об/хв. Надосадову рідину наносили на колонки і центрифугували протягом 1 хв за 13000 об/хв. Колонки промивали (750 мкл буфера). Елюювали плазмідну ДНК 40 мкл 10 мМ Трис-НСІ (рН 8.0), інкубувавши буфер на колонках 1 хв і центрифугуючи протягом 1 хв за 13000 об/хв. Плазмідну ДНК зберігали за температури  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**2.3.5.2. Виділення плазмідної ДНК з використанням Midi Prep (Nucleobond).** На чашку Петрі з селективним антибіотиком висівали клітини Top10 *E. coli*, що містили конструкцію рUC18-тРНК<sup>Тир</sup> і нарощували протягом 14 год за  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Відбирали поодинокі колонії, інокулювали її в 5 мл поживного середовища LB та ростили протягом 6 год при перемішуванні 170 об/хв. Препаративну культуру (500 мл) отримували нарощуванням протягом 16 год ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 170 об/хв) після додавання денної у співвідношенні 1:1000. Ресуспендування, лізис клітин, нейтралізація, очищення лізату та промивання осаду ДНК відбувалась згідно з рекомендаціями виробника (Macherey-Nagel). Осадження здійснювалось ізопропанолом за умов: 15000 g ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) – 30хв, з подальшим промивання 70% етанолом за умов 15000 g ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) протягом 10 хв. Отриманий осад висушували під вакуумом та розчиняли в 1х ТЕ-буфері.

**2.3.5.3. Переосадження ДНК.** До зразку додавали 1/10 об'єму 3М калій ацетату (рН 5.0), 2 об'єми холодного етилового спирту, витримували у

замороженому стані 3-16 год. Центрифугували зразок при 4 °С протягом 10 хв 12000 об/хв, утворений осад ДНК промивали 70% етиловим спиртом, центрифугували за тих же умов, осад висушували під вакуумом і розчиняли у відповідному буферному розчині.

**2.3.5.4. Електрофорез в 1% агарозному гелі.** Агарозу у відповідній кількості розчиняли у 1x TBE-буфері (50 mM Тріс-НСl (рН 8.0), 50 mM борна кислота, 1 mM ЕДТА), цей же буфер використовували як електродний. В буферний TBE розчин для зразків ДНК вносили 0,1% розчин бромфенолового синього та ксиленціанолу і 35% гліцерин. Для візуалізації використовували фарбування гелю етидіум бромідом (10 мкг/мл) і опромінення ультрафіолетом.

**2.3.6. Синтез тРНК<sup>Тир</sup> *in vitro* та електрофорез РНК у 8%-му ПААГ.** рUC18 плазміда, що містила ген *Thermus thermophilus* тРНК<sup>Тир</sup> була люб'язно надана с.н.с. Яремчук Г.Д. Ген тРНК<sup>Тир</sup> експресували в клітинах *E.coli* Top10 та очищали за допомогою NucleoBond Xtra MidiPrep Kit (Macherey-Nagel, США), потім лінеаризували з допомогою рестриктази MvaI (Fermentas). Після рестрикції було проведено аналітичну транскрипцію з метою перевірки роботи системи. Результати аналітичної транскрипції перевірялись за допомогою 8% ПААГ з 7М сечовиною. Препаративну кількість тРНК<sup>Тир</sup> отримували у реакції транскрипції *in vitro* за участі T7-полімерази в таких умовах: 100 mM Тріс-НСl (рН 8,0), 2 mM спермідин, 20 mM ГМФ, 4 mM АТФ/ГТФ/ЦТФ/УТФ, 10 mM ДТТ, 150 мкг/мл плазмідної ДНК, 300 мкг/мл T7-полімерази протягом 4 год при 38,5 °С. Результати транскрипції були візуалізовані за допомогою 8% ПААГ з 7М сечовиною.

Гель складався з 8% акриламід, 0,4% бісакриламід, 42% сечовини, буферу TBE (50 mM Тріс, 50 mM борна кислота, 1 mM ЕДТА), включав 0,15% персульфату амонію, 0,04% TEMED. Пре-електрофорез проходив за I = 10 mA, електрофорез – за 20 mA. Проби наносили у буфері (0,1% бромфенол голубий, 0,1% ксиленціанол, 8 M сечовина, буфер TBE), гель фарбували (13,5%

оцтовокислий натрій, 2% оцтова кислота, 0,2% метиленовий синій), відмивали 2 % оцтовою кислотою.

### 2.3.7. Очистка препаратів тРНК.

**2.3.7.1. Очищення тРНК<sup>Тир</sup> методом аніонної хроматографії.** Аніонна хроматографія – метод, що дозволяє затримати на сорбенті негативно заряджені аніони, оскільки нерухома фаза сорбенту має позитивний заряд. Транскрипт очищали хроматографією на DEAE-Toyopearl 650M («ToyoSoda», Японія) в 10 мМ Тріс-НСІ (рН 7.5), що містила 10 мМ MgCl<sub>2</sub>; елюювали – 0,6 М NaCl, осаджували етанолом і ренатурували нагріванням при 68 °С в 5 мМ Тріс-НСІ (рН 7.5), 3 мМ MgCl<sub>2</sub> протягом 3 хв з подальшим додаванням MgCl<sub>2</sub> до кінцевої концентрації – 10 мМ та повільним охолодженням на водяній бані до кімнатної температури (орієнтовно – 1,5 год). Концентрацію тРНК в елюаті визначали спектрофотометрично та за допомогою програми ExtCoeff.

**2.3.7.2. Відщеплення ССА кінця тРНК<sup>Тир</sup> *Thermus thermophilus*.** Відрізання ССА-кінця проводили з використанням 0,005 од/мл фосфодіестерази І з отрути *Crotalus adamanteus* («Sigma») протягом 45 хв при кімнатній температурі в 50 мМ Тріс-НСІ (рН 8.0), 10 мМ MgCl<sub>2</sub> та 20 мкМ транскрипту. Витримавши 45 хв при кімнатній температурі, додавали 1 об'єм фенолу (рН 6.0) та центрифугували за швидкості 3000 g протягом 10 хв, відбирали надосадову рідину, центрифугували повторно за тих же умов. Додавали 0,1 об'єму ацетату натрію (рН 5.02) та осаджували трьома об'ємами холодного 96% етилового спирту.

**2.3.7.3. Очищення тРНК<sup>Тир</sup> методом ВЕРХ.** Екстраговану фенол-хлороформом та осаджену етанолом тРНК<sup>Тир</sup> очищали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ або HPLC) на колонці ProSwift<sup>™</sup> Wax-1S (DIONEX). Колонку попередньо врівноважували 200 мМ NaCl в буфері А (20 мМ Тріс-НСІ (рН 7.5), 8 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10% ізопропанол), тРНК<sup>Тир</sup> елюювали за програмованими лінійними

градієнтами буфера В (1 М NaCl в буфері А) та осаджували етанолом. Перед використанням тРНК переосаджували та ренатурували за 68 °С.

**2.3.7.4. Добудова ССА-кінця *T. thermophilus* тРНК<sup>Тир</sup> та синтез тРНК, модифікованих за А76 – 2'dА76 тРНК<sup>Тир</sup> та 3'dА76 тРНК<sup>Тир</sup>.** А76 тРНК<sup>Тир</sup> та її 2'- та 3'-дезоксипохідні генерувались із ССА-дефіцитних тРНК<sup>Тир</sup> шляхом додавання ССА-кінця ферментом *Bacillus stearothermophilus* нуклеотидилтрансферазою (NTase). 15 мкМ транскрипт інкубували при 60 °С у 100 мМ гліцин-NaOH (рН 9.0), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДТТ, 100 мкМ ЦТФ у присутності 100 мкМ АТФ («Sigma») або 2 мМ 2'd/3'dАТФ («Sigma») за участі 150 нМ NTази протягом 5 хв (для тРНК дикого типу) та з 5 мкМ NTазою протягом 45 хв (для 2'- та 3'-кінцевих модифікацій). А76 тРНК<sup>Тир</sup> екстрагували фенолом (рН 6.0), осаджували етанолом і очищали за допомогою ВЕРХ, як описано вище.

**2.3.7.5. Очистка препаратів тРНК, модифікованих за А76 – 2'dА76 тРНК<sup>Тир</sup> та 3'dА76 тРНК<sup>Тир</sup> *T. thermophilus*.** Препарати 2'd- та 3'dА76 тРНК<sup>Тир</sup> очищали електрофорезом в 8% денатуруючому поліакриламідному гелі, що містив 7М сечовину. тРНК наносили на 8% ПААГ, вирізували смугу гелю з тРНК, розтирали гель з додаванням 3 об'ємів (відносно гелю) 0,5 М ацетамонію (рН 5.5), 0,1 мМ ЕДТА, 0,1% ДСН. Суміш заморожували при -20 °С, після розморожування – перемішували, центрифугували зі швидкістю 3000 g протягом 15 хв, відбирали надосадову рідину, центрифугували повторно. Додавали 0,1 об'єму 3М ацетату натрію рН 5.0, центрифугували за тих же умов, осаджували 3 об'ємами 96% етилового спирту, після зберігання при -20 °С осади промивали 75% етиловим спиртом та висушували під вакуумом. Всі зразки ренатурували та перевіряли на їхню функціональну активність.

**2.3.8. Окислення тРНК періодатом натрію.** Для підтвердження однорідності термінального аденозину (А) ми обробляли аліквоти мічених тРНК періодатом натрію (NaIO<sub>4</sub>). Таким чином, окислені 2'd та 3'dА76 тРНК<sup>Тир</sup>/тРНК<sup>Ала</sup> отримували шляхом інкубації 3 мкМ тРНК<sup>Тир</sup> у

100 мМ NaOAc (рН 5.02), 3 мМ NaIO<sub>4</sub> (Sigma) при кімнатній температурі протягом 2 годин у темряві. Для позбавлення від надлишку NaIO<sub>4</sub> проводили інкубацію з етиленгліколем, як описано в [165].

## **2.4. Методи роботи з білками**

### **2.4.1. Визначення концентрації білка методом Бредфорд.**

Концентрації білків в хроматографічних фракціях та фінальних препаратах вимірювали методом Бредфорд [166], що базується на вимірюванні максимуму поглинання барвника Coomassie G-250 при утворення комплексу «білок-барвник». Реагент Roti<sup>®</sup>-Quant («Roth», Німеччина) використовували для аналітичного аналізу, в свою чергу Bradford reagent («Sigma», США) – для оцінки остаточної концентрації протеїнів у зразках.

**2.4.2. Електрофоретичне розділення білків у поліакриламідному гелі.** Поліакриламідний гель складався з двох шарів: розділяючий гель (8% акриламід, 0,25% бісакриламід, 0,375 М Tris-HCl (рН 8.8), 0,1% SDS, 0,15% персульфат амонію, 0,04% TEMED) та концентруючий гель (5% акриламід, 0,2% бісакриламід, 0,1 М Tris-HCl (рН 6,8) 0,1% SDS, 0,15% персульфат амонію, 0,04% TEMED). Електродний буфер містив 0.05 М Tris-HCl, 28,8 мг/мл гліцин, 0,1% SDS. Міграція білків проходила за I = 10 мА у концентруючому гелі та 30 мА – в розділяючому гелі. Проби наносили у буфері (30% β-меркаптоетанол, 6% SDS), додаючи барвник – бромфеноловий синій. Гель фарбували кип'ятінням з Coomassie R-250 в 7% оцтовій кислоті. Відмивали гель кип'ятінням з 7% оцтовою кислотою.

### **2.4.3. Виділення та очистка рекомбінантної ДТД та її мутантних форм.**

**2.4.3.1. Тест експресії ДТД в різних середовищах.** Клітини *E.coli* BL21(DE3)pLysS трансформували шляхом електропорації плазмідною ДНК з pProExHTb-ДТД. Аналіз рівня експресії проводили в середовищах LB (Luria-Broth), TB (Terrific-Broth), P (фосфатне середовище), 2x TY, доповнених

ампіциліном та хлорамфеніколом («Euromedex», Франція). Попередню культуру (5 мл) вирощували протягом ночі при 37 °С. Культуру (50 мл кожного середовища) інокулювали попередньою культурою в розведенні 1:100. Продовжували ріст бактерій до  $A_{600} = 0,6$  о.од. та індукували 0,6 мМ IPTG («Thermo Scientific», Литва) протягом 5 год. Екстракт розчинних білків готували з 1 мл об'єму культури за протоколом Zerbs et al. для аналізу розчинності білка [167].

**2.4.3.2. Очищення ДТД методами афінної, аніон-обмінної та гель-фільтраційної хроматографій.** Попередню культуру клітин *E. coli* BL21(DE3)pLysS (50 мл), що містила рекомбінантні плазміди, вирощували протягом ночі при 37 °С у ТВ-середовищі з додаванням відповідних антибіотиків. Культуру (2.5 л) інокулювали нічною культурою в розведенні 1:100 і вирощували при 37 °С у ТВ-середовищі, доповненому ампіциліном (100 мкг/мл) та хлорамфеніколом (35 мкг/мл). Експресію ДТДТТ індукували додаванням 0.6 мМ IPTG при  $A_{600} = 0.6$  о.од. і продовжували нарощувати культуру протягом 4 год при 37 °С.

Клітини збирали центрифугуванням протягом 15 хв при  $6000 \times g$  (4 °С). Осад бактеріальних клітин ресуспендували в 70 мл 25 мМ Тріс-НСІ (рН 7.5), 1 мМ PMSF, 10 мМ  $\beta$ -меркаптоетанолу, доповненого 1.5 таблетками коктейлю інгібіторів протеаз. Клітини інкубували на льоду протягом 30 хв для повного лізису і руйнували ультразвуком  $8 \times 30$  сек з 1 хв перервами (4 °С). Всі наступні етапи проводили при 4 °С. Залишки клітин доосаджували центрифугуванням при  $20\ 000 \times g$ . Було отримано прозорий супернатант, до якого додали хлорид натрію та імідазол («Sigma», США) до концентрацій 300 мМ та 10 мМ відповідно. Отриманий розчин змішували з Ni-NTA Sepharose Fast Flow (5 мл 50% суспензії, «GE Healthcare», Швеція), попередньо врівноваженою тим же буферним розчином та інкубували протягом 1.5 год при 130 об/хв. Потім Ni-NTA промивали буферним розчином А (25 мМ Тріс-НСІ (рН 7.5), 0.1 мМ PMSF, 1 мМ  $\beta$ -меркаптоетанол, 300 мМ NaCl, 10 мМ імідазол), а потім буфером А, що містив 600 мМ NaCl. ДТД елюювали з колонки буферним

розчином А з 400 мМ імідазолом. Зібрані фракції аналізували за допомогою SDS-PAGE. Найчистіші фракції об'єднували і діалізували протягом ночі проти відповідного буферного розчину для подальшого розщеплення TEV-протеазою – буферного розчину В (50 мМ Tris-HCl (рН 7.5), 0.1 мМ PMSF, 1 мМ ДТТ, 0.5 мМ EDTA). Після діалізу 6 гістидинових залишків (His-tag) відрізали від ДТД рекомбінантною TEV-протеазою таким чином: 1  $A_{280}$  TEV на 5  $A_{280}$  ДТД під час розщеплення протягом ночі при 4 °С [168].

Отриманий препарат білка після першої стадії очищення розбавляли до 1  $A_{280}$  одиниць/мл і наносили на колонку Q-Sepharose Fast Flow («Pharmacia», Швеція) (1.35x4 см, V = 6 мл), попередньо врівноважену буферним розчином В. Колонку промивали тим же буферним розчином. Елюцію проводили зі швидкістю потоку 0,6 мл/хв з лінійним градієнтом 200-800 мМ NaCl (70 мл). Фракції, що містили білок, виявляли за методом Бредфорд та аналізували за допомогою 15% ПААГ в денатуруючих умовах. Зібрані фракції з ДТД, діалізували протягом ночі проти 25 мМ Tris-HCl (рН 7.5), 1 мМ ДТТ при 4 °С і концентрували на 10 кДа Centricon («Merck», Німеччина) при 5500 об/хв до 4.54  $A_{280}$  одиниць/мл ( $\approx$  12 мг/мл).

Для відділення нашого цільового білка від високомолекулярних забруднень використовували гель-фільтраційну хроматографію на колонці Hi-Load 16/60 Superdex S 200 (150 мл, «Pharmacia Biotech», Швеція), попередньо врівноважену 25 мМ Tris-HCl (рН 7.5), 1 мМ ДТТ, 150 мМ NaCl, 0,003% NaN<sub>3</sub>, зі швидкістю потоку 0.5 мл/хв. Фракції елюції аналізували за допомогою 15% ПААГ в денатуруючих умовах. Фракції, що містили деацилазу, об'єднували і концентрували до 8 мг/мл. Фермент доповнювали 50% гліцерином і зберігали при температурі -20 °С.

Молярний коефіцієнт екстинкції при 280 нм ( $\epsilon_{280} = 5960 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) та масовий коефіцієнт ( $A_{280} (1 \text{ мг/мл}) = 0.354$ ) розраховували з амінокислотної послідовності ДТД (інструмент ProtParam, ExPASy, Swiss Port) і використовували для визначення концентрації ферменту.

#### **2.4.3.3. Вестерн-блот аналіз ДТД до та після обробки TEV-протеазою.**

Білки розділяли на 15% SDS-PAGE і переносили на підготовлену 0,45 мкм полівінілдіфлуоридну (PVDF) мембрану (інкубували 1 хв з метанолом і одноразово промивали Towbin-буфером («Bio-Rad», США)) для Транс-Блот напівсухого електрофоретичного переносу (Trans-Blot Semi-Dry electrophoretic transfer) («Bio-Rad», США). Мембрану блокували протягом ночі 5% знежиреним молоком у буферному розчині PBST (PBS, або натрій-фосфатний буфер, з 0.5% Tween-20). Після блокування мембрану інкубували з анти-His моноклональними антитілами («Sigma», США) в розведенні 1:6000 протягом 1 год при кімнатній температурі. Потім мембрану інтенсивно промивали буфером PBST (4 рази × 5 хв) і обробляли вторинними анти-мишачими антитілами (Jackson Immuno Research Inc., США), кон'югованими з пероксидазою, при 1:10000 робочому розведенні протягом 1 год. Після цієї інкубації проводили інтенсивне (4 рази × 5 хв) промивання PBST. Імунні комплекси були виявлені за ECL-протоколом (EMD Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate) («Millipore», США) за допомогою рентгенівської плівки.

**2.4.4. Виділення та очистка рекомбінантної АлаРС.** Продукцію рекомбінантного білка з полігістидиновою послідовністю запускали індукцією 0.6 мМ IPTG протягом 3 год при 37 °С у Р-середовищі (1 л). Всі етапи очищення His-АлаРС проводили при 4 °С. Зібрані клітини після 30 хв центрифугування (15 000 g) ресуспендували в буфері С (50 мМ Тріс-НСІ (рН 8.0), 300 мМ NaCl, 1 мМ β-меркаптоетанол, 1х коктейль інгібіторів протеаз («Roche»)), руйнували ультразвуком 10 × 30 сек з 1 хв перервами. Потім збирали осад клітин осадженням (20 000 g, 30 хв), нагрівали на водяній бані (70 °С) і знову центрифугували. Концентрацію імідазолу («Sigma») доводили до 15 мМ і прозорий супернатант додавали до Ni-NTA Sepharose Fast Flow (2 мл 50% суспензії, «GE Healthcare»), попередньо врівноваженої тим же буфером та інкубували протягом 1 год при 150 об/хв. Ni-NTA сефарозу промивали буфером С, доповненим 15 мМ імідазолом з подальшим промиванням



розчином, що містив 500 мМ NaCl. АлаРСТТ елюювали з колонки 250 мМ імідазолом (як і фермент *E. coli* [56]). Цільові білкові фракції об'єднували і діалізували протягом ночі проти 1 л буфера D (50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 5 мМ MgCl<sub>2</sub> (як було рекомендовано для *Archaeoglobus fulgidus* АлаРС [169]), 1 мМ β-меркаптоетанол), концентрували на 30 кДа Centricon при 6000 об/хв до об'єму 1 мл у концентрації ≈ 4 мг/мл) і завантажували на колонку Hi-Load 16/60 Superdex 200, попередньо врівноважену буфером D, доповнену 150 мМ NaCl, 0,1 мМ PMSF, 0,003% NaN<sub>3</sub>) зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Пікові фракції концентрували на 30 кДа Centricon (перед концентрацією цю фракцію розбавляли в 3 рази в 1 мМ β-меркаптоетанолі в насиченому розчині (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> у пропорції 1:20), чистоту аналізували за допомогою ПААГ в денатуруючих умовах.

**2.4.5. Аналітична гель-фільтрація білків.** Для визначення орієнтовної молекулярної маси ДТД та АлаРС використовували систему ВЕРХ на колонці Hi-Load 16/60 Superdex S200 (150 мл, «Pharmacia Biotech»). Колонку попередньо врівноважували 25 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 1 мМ ДТТ, 150 мМ NaCl, 0.003% NaN<sub>3</sub>. Всі зразки наносили і розділяли зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Вільний об'єм колонки ( $V_o$ ) визначали за синім декстраном (2 МДа). Для калібрування використовували такий набір маркерних білків: феритин (450 кДа), каталаза (240 кДа), β-амілаза (200 кДа), алкогольдегідрогеназа (150 кДа), бичачий альбумін сироватки (66 кДа), ячний альбумін (45 кДа), карбоангідраза (29 кДа), цитохром с (12.4 кДа). Молекулярну масу ДТД та АлаРС визначали шляхом порівняння його індексу  $V_e/V_o$  з показниками білків-маркерів. Логарифми молекулярних ваг маркерних білків були побудовані відповідно до співвідношень їхніх об'ємів елюції до вільного об'єму колонки ( $V_e/V_o$ ).

## 2.5. Методи ферментативної кінетики

### 2.5.1. Отримання препаратів [<sup>32</sup>P]-тирозил/гліцил/аланіл-тРНК.

**2.5.1.1. Перевірка функціональної активності отриманих препаратів тРНК<sup>Тир</sup>.** Реакційні суміші містили 25 мМ Тріс-НСl рН 7,5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ АТФ, 5 мкМ тРНК<sup>Тир</sup> (з ССА–кінцем або без нього), 100 нМ ТирРС, 48 мкМ [<sup>14</sup>C]-L-Тир. Паралельно готувались контролю сорбції амінокислоти на фільтрах GF/C.

Реакційну суміш витримували при 37 °С протягом 30 хв, відбирали на певних часових проміжках (1, 2, 5, 15, 30 хв) аліквоти по 12.5 мкл, додавали до холодної 10% ТХО (4 °С), таким чином зупиняючи реакцію. Проби наносили на фільтри GF/C та промивали 2 об'ємами 3% ТХО. Фільтри переносили в ємності з сцинтиляторною рідиною та проводили вимірювання рівня радіоактивності на сцинтиляторі («Perkin Elmer»).

**2.5.1.2. Отримання [<sup>32</sup>P]-мічених тРНК<sup>Тир</sup> та тРНК<sup>Ала</sup>.** Синтез [<sup>32</sup>P]-А76 тРНК<sup>Тир</sup> виконували з допомогою 150 нМ NТази, 10 мкМ тРНК<sup>Тир</sup> (без ССА-кінця), 10 мкМ ЦТФ та 0,8 мкМ [<sup>32</sup>P]-АТФ (3000 Сі/ммоль; Perkin Elmer). [<sup>32</sup>P]-2'd та [<sup>32</sup>P]-3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> синтезували за участі 10 мкМ NТази та 125 мкМ 2'd/3'dАТФ і близько 5 мкМ [<sup>32</sup>P]-2'dАТФ (6000 Сі/ммоль; Perkin Elmer) або [<sup>32</sup>P]-3'dАТФ (5000 Сі/ммоль; Perkin Elmer) протягом 30 хв при 60 °С. Всі варіанти [<sup>32</sup>P]-міченої тРНК<sup>Тир</sup> очищали електрофорезом в 8% денатуруючому поліакриламідному гелі, що містив 7М сечовину та повторно ренатурували та окислювали періодатом натрію. [<sup>32</sup>P]-мічення А76 тРНК<sup>Тир</sup>/2'dA76/3'dA76 призвело до зниження плато аміноацилювання з L-Тир з 90% до 85% (А76 тРНК<sup>Тир</sup>) і 50% (2'd тРНК<sup>Тир</sup>) відповідно (порівняно з тестуванням із [<sup>14</sup>C]-L-Тир). Аналогічні ефекти спостерігалися і в інших системах [170]. Рівень насичення 2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> в реакції аміноацилювання з D-Тир становив 12%. А76 та 3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> досягали рівню насичення D-Тир до того ж рівня, як зазначено вище для L-Тир.

Синтез  $[^{32}\text{P}]\text{-A76 тРНК}^{\text{Ала}}$  проводили з використанням 150 NTази, 10 мкМ  $\text{тРНК}^{\text{Ала}}$  (без ССА-кінця), 10 мкМ ЦТФ і 0,8 мкМ  $[^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$  (3000 Сі/ммоль; Perkin Elmer) протягом 5 хв при 60 °С відповідно до рекомендацій в [171]. Зразок очищали, використовуючи 8% денатуруючий поліакриламідний гель з 7М сечовиною, осаджували етанолом і ренатурували. Окислену  $\text{тРНК}^{\text{Ала}}$  або  $\text{тРНК}^{\text{Ала}}_{\text{ок}}$  (що використовувалась в якості контролю в тестах накопичення АМФ) отримували шляхом інкубації 3 мкМ  $\text{тРНК}^{\text{Ала}}$  в темряві в 100 мМ NaOAc (рН 5.02), 3 мМ періодаті натрію ( $\text{NaIO}_4$ ) («Sigma») при кімнатній температурі протягом 2 год. Інкубацію з етиленгліколем проводили для усунення надлишку  $\text{NaIO}_4$ , як описано в [165].

### 2.5.2. Реакції аміноацилювання за допомогою ТирРС *T. thermophilus*.

Реакції аміноацилювання проводили в 25 мМ HEPES-NaOH (рН 7.5), 5 мМ ДТТ, 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2 мМ АТФ, 15 мМ KCl, 100 мкг/мл БСА, 5 мкМ  $\text{тРНК}^{\text{Тир}}$ , 48 мкМ  $[^{14}\text{C}]\text{-L-Тир}$  (600 мСі/ммоль; ЧССР) при 37 і 60 °С з різними концентраціями ТирРС. Аліквоти збирали у відповідних часових проміжках, гасили холодною 10% ТХО і пропускали через 3ММ-фільтри, аналізуючи за допомогою підрахунку рідкої сцинтиляції [172].

Реакції з  $[^{32}\text{P}]\text{-міченою тРНК}^{\text{Тир}}$  проводили при 60 °С в буфері для ТирРС з 0.25-200 мкМ L/D-Тир, 200 мкг/мл БСА, 5 мкМ  $\text{тРНК}^{\text{Тир}}$  та залишковими кількостями  $[^{32}\text{P}]\text{-міченої тРНК}^{\text{Тир}}$ . Реакцію зупиняли додаванням 3 мкл 200 мМ NaOAc до аліквоти 1.5 мкл, з подальшою обробкою за участі S1 або P1-нуклеаз згідно протоколу [171]. Аліквоти (по 1.5 мкл кожна) наносили на поліетиленімін-целюлозні (PEI) пластини (Merck KGaA, Німеччина), попередньо промиті ddH<sub>2</sub>O. Розділення продуктів реакції відбувалося за методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) у 0.1 М амоній ацетату та 5% льодяній оцтовій кислоті [173] з подальшим фосфор-аналізом з використанням програми PharosFX™ Plus та програмного забезпечення QuantityOne (BioRad). Концентрацію аміноацильованих тРНК вимірювали аналогічно до методики, описаної в [174].

Препаративні кількості L-Тир-[ $^{32}\text{P}$ ]-тРНК<sup>Тир</sup> були отримані протягом 10 хв при 37 °С (10 мкМ L-Тир, 100 нМ ТирРС, 5 мкМ тРНК<sup>Тир</sup>, слідові кількості [ $^{32}\text{P}$ ]-міченої тРНК<sup>Тир</sup>) та D-Тир-[ $^{32}\text{P}$ ]-тРНК<sup>Тир</sup> – протягом 40 хв при 37 °С (10 мкМ D-Тир, 1 мкМ ТирРС). Після реакції аміноацильовану тРНК<sup>Тир</sup> екстрагували кислим фенолом та осаджували етанолом; осад тРНК<sup>Тир</sup> ресуспендували в 20 мМ NaOAc (рН 5,02) і зберігали при температурі -20 °С. Вихід Тир-тРНК<sup>Тир</sup> оцінювали за допомогою ТШХ-аналізу після обробки зразка тРНК<sup>Тир</sup> Р1-нуклеазою. Сумарний вихід аміноацил-тРНК становив: приблизно 85% L-Тир-A76/3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup>, 50% L-Тир-2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup>, 65% D-Тир-A76/3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> та 12% D-Тир-2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup>.

### 2.5.3. Аналіз гідролізу АТФ у реакції з АлаРС та ТирРС.

#### 2.5.3.1. Тест на активність аміноацилювання препарату АлаРС.

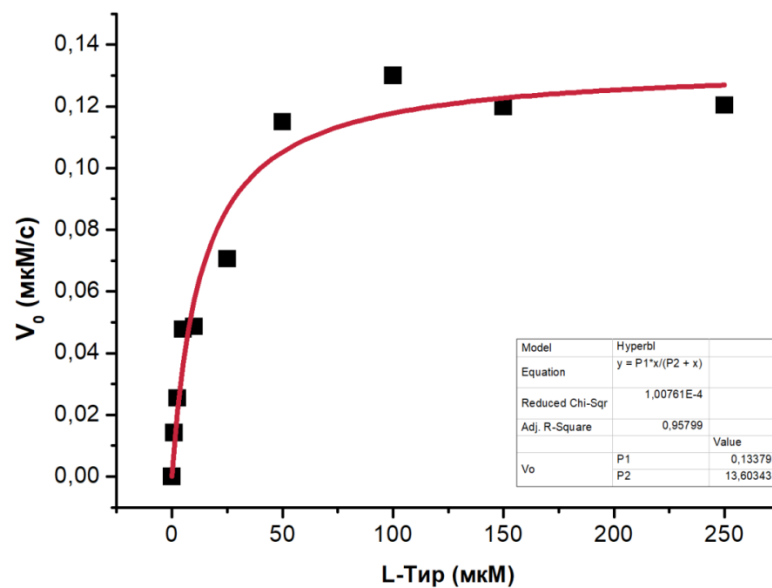
Реакційну суміш (25 мкл), що містила 100 мМ Тріс-НСІ (рН 7.5), 15 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мкг/мл БСА, 3 мМ АТФ, 25 мкМ [ $^{14}\text{C}$ ]-L-Ala (158 мкг/ммоль; «Amersham»), 5 мкг/мкл сумарної *E. coli* тРНК, 50 нМ АлаРС інкубували при 37 °С протягом декількох хвилин. Аліквоти відбирали з реакції у відповідні моменти часу, зупиняючи реакцію холодною 10% ТХО. Утворені осадки переносили на GF/C фільтри, відмивали їх 5% ТХО, висушували й обраховували рівень радіоактивності на сцинтиляційному лічильнику.

**2.5.3.2. АТФ-ФФ<sub>н</sub> обмін за участі АлаРС та ТирРС.** Пірофосфатний обмін (АТФ-ФФ<sub>н</sub>) за участі АлаРС здійснювали при 60 °С в реакційному буфері АлаРС, що складався з 75 мМ NEPES-NaOH (рН 7.5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ KCl, 1 мМ ДТТ, 4 мМ АТФ і доповнювався 1 мМ [ $^{32}\text{P}$ ]-ФФ<sub>н</sub> (5 мкCi/мл; Perkin Elmer). Концентрації L/D-аланіну, гліцину, L/D-серину (Sigma) змінювались в межах 0.07–14 K<sub>m</sub> (константа Міхаеліса-Ментен) (L-Ала), 0.05–11 K<sub>m</sub> (D-Ала), 0.23–11 K<sub>m</sub> (Глі), 0.05–10 K<sub>m</sub> (L-Сер) та 0.12–2.5 K<sub>m</sub> (D-Сер). Найвища концентрація D-Сер (2.5 K<sub>m</sub>, 1 М) була обмежена його низькою розчинністю. Реакції запускали ферментом у різних концентраціях для кожного субстрату. Аліквоти (1.5 мкл) відбирали в конкретні моменти часу, зупиняючи реакцію

холодним 400 мМ NaOAc (pH 5.02), обробляли S1-нуклеазою (ThermoScientific) і проводили аналіз на тонкошаровій хроматографії (ТШХ або TLC) згідно з [175]. Для визначення кінетичних параметрів (значень  $K_m$  і  $k_{cat}$ ) з графіка Міхаеліса-Ментен за формулою (1) (рис. 2.1) були використані значення мінімум трьох незалежних вимірювань та обчислені в програмі OriginPro 8.5 (Hyperb за формулою (2)). Пластини ТШХ кількісно обраховували за допомогою фосфорного аналізатора з використанням системи PharosFX™ Plus та програмного забезпечення QuantityOne («BioRad»).

$$(1) \quad V_o = \frac{dP}{dt} = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2) \quad y = \frac{P1 \times x}{P2 + x}$$

$V_{max}$  (P1) – максимальна швидкість реакції при повному насиченні фермента субстратом,  $K_m$  (P2) – константа Міхаеліса-Ментен, або та концентрація субстрату, за якої швидкість реакції дорівнює половині максимальної.



**Рис. 2.1.** Приклад обчислення каталітичних параметрів з графіку Міхаеліса-Ментен: активація L-Тир у АТФ-ФФ<sub>H</sub> обміні за участі ТирРС ( $K_m = 13.6$  мкМ,  $V_{max} = 0.133$  мкМ/с)

Реакційний буферний розчин для ТирРС був таким: 25 мМ HEPES-NaOH (рН 7.5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 15 мМ KCl, 5 мМ ДТТ. Концентрації АТФ та [<sup>32</sup>P]-ФФн були такими ж, як зазначено вище для АлаРС; L-Тир (Pierce) і D-Тир (Sigma) коливались в межах 0.11–11 K<sub>m</sub> і 0.04–18 K<sub>m</sub> відповідно.

**2.5.4. Реакції аміноацилювання, деацілювання та загальний аналіз редагування за участі АлаРС.** Аміноацилювання за участі АлаРС проводили з використанням радіоактивноміченої тРНК<sup>Ала</sup> 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.

Препаративні кількості L-Ала-[<sup>32</sup>P]-тРНК<sup>Ала</sup> отримували протягом 15 хв при 37 °С у стандартному АлаРС буфері, доповненому 1 мМ L-Ала, 100 нМ АлаРС, 10 мкМ тРНК<sup>Ала</sup> та 4 мМ АТФ. Помилково аміноацильовані D-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> та Глі-тРНК<sup>Ала</sup> були отримані з використанням мутантної форми АлаРС (С666А) *E. coli*, що втратила здатність до редагування. D-Ала- [<sup>32</sup>P]-тРНК<sup>Ала</sup> генерували протягом 25 хв при 37 °С (500 мМ D-Ала, 5 мкМ АлаРС (С666А) *E. coli*, 10 U/мл неорганічної пірофосфатази з пекарських дріжджів – ФФ<sub>н</sub>аза або PPIase); Глі-[<sup>32</sup>P]-тРНК<sup>Ала</sup> – 20 хв при 37 °С (750 мМ Глі, 500 нМ АлаРС (С666А) *E. coli*, 2 мМ АТФ). Після реакції аміноацильовану тРНК<sup>Ала</sup> екстрагували кислим фенолом та осаджували етанолом. Осад аміноацильованої тРНК<sup>Ала</sup> ресуспендували в 20 мМ NaOAc (рН 5.02) і зберігали при температурі –20 °С. Вихід L/D-Ала/Глі-тРНК<sup>Ала</sup> оцінювали за допомогою ТШХ-аналізу після обробки зразків тРНК<sup>Ала</sup> S1-нуклеазою. Всі аміноацильовані тРНК<sup>Ала</sup> мали орієнтовний рівень насичення субстратом – 30%.

Відсоток рівня редагування визначали за концентрацією утвореного [<sup>32</sup>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 [<sup>32</sup>P]-АТФ (3000 Сі/ммоль, Perkin Elmer) та 100 мкг/мл БСА у відсутності або у присутності 10 мкМ тРНК<sup>Ала</sup> або тРНК<sup>Ала</sup><sub>Ок</sub> та 1 мкМ АлаРС. Реакції запускали додаванням 5× ферменту, зупиняли (1.5 мкл

аліквоти) в 3 мкл 400 мМ NaOAc з подальшою обробкою S1-нуклеазою (1,5 мкл аліквоти в 3 мкл 4 U/мкл розчину S1) та ТШХ-аналізом.

**2.5.5. Аналіз гідролізу препаратів тирозил-тРНК<sup>Тир</sup> за участі ДТД та гліцил/аланіл-тРНК<sup>Ала</sup> за участі ДТД та АлаРС.** Деацилювання субстратів L/D-Тир-[<sup>32</sup>P]-тРНК<sup>Тир</sup> проводили у стандартному реакційному буфері для ДТД (25 мМ HEPES-NaOH (рН 7.5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ ДТТ, 100 мкг/мл БСА), доповненому різними концентрації ДТД при 37 °С. Реакції деацилювання за участі АлаРСТТ проводили з використанням 0.25 мкМ L/D-Ала/Глі-[<sup>32</sup>P]-тРНК<sup>Ала</sup> 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.

Кінетичні параметри визначалися з графіку Міхаеліса-Ментен з використанням Origin 8.5 і являють собою середні значення з трьох незалежних експериментів. В кожному експерименті визначали параметри, а потім отримували середнє  $\pm$  SD або  $\pm$  SE.

## 2.6. Біоінформатичний аналіз та статистична обробка результатів

В роботі були використані інструменти для аналізу нуклеотидних та білкових послідовностей (Clustal Omega, MEGA, BLAST, ProtParam, Extinction Coefficient Calculator) та візуалізації структур білково-нуклеїнових комплексів (PyMol). Експериментальні дані з 3-4 незалежних повторів оброблялись статистично з обчисленням середнього значення (M), середнього квадратичного відхилення ( $\delta$  або  $\pm$ SD) і середньої квадратичної похибки (m або  $\pm$ 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.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

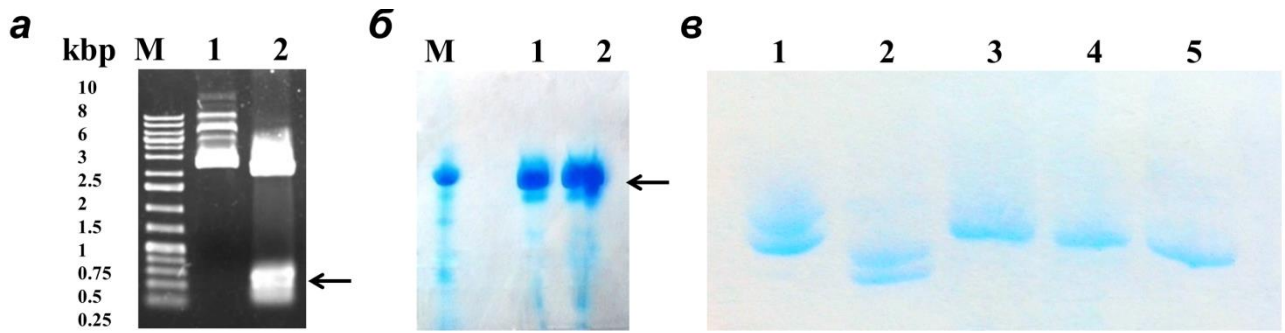
#### 3.1. Вивчення процесу аміноацилювання D-Тир за участі ТирРС *T. thermophilus* та ролі гідроксильних груп А76 тРНК<sup>Тир</sup> в ньому

**3.1.1. Отримання модифікованих по 2'- та 3'-положеннях рибози А76 тРНК<sup>Тир</sup>.** Попередніми дослідженнями відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології та генетики НАНУ було виявлено, що L-Тир приєднується як до 2'-, так і до 3'-гідроксильних груп кінцевого аденозину А76 тРНК<sup>Тир</sup> за участі ТирРС *Thermus thermophilus*. Раніше цей факт було встановлено для ТирРС інших видів, однак сайт приєднання D-Тир до А76 тРНК<sup>Тир</sup> дотепер залишався невідомим, а відтак став предметом нашого дослідження.

На першому етапі роботи було отримано препарати тРНК<sup>Тир</sup> дикого типу та модифіковані по 2'- або 3'-ОН положеннях рибози А76 тРНК<sup>Тир</sup>, а також досліджено кінетичні параметри їх аміноацилювання за участі ТирРС.

ДНК-матриця з геном *T. thermophilus* тРНК<sup>Тир</sup> була отримана в результаті рестрикції з допомогою рестриктази MvaI (BstNI). Результат препаративної рестрикції показано на рис. 3.1. а. Отриманий фрагмент використовували для *in vitro* транскрипції за участі T7-полімерази протягом 4 год при 38.5 °C (рис. 3.1. б). Після цього тРНК очищали на аніон-обмінній колонці та на системі ВЕРХ, проводили реакцію відщеплення ССА-кінця тРНК<sup>Тир</sup> за участі фосфодіестерази I з отрути *Crotalus adamanteus* та проводили добудову ССА-кінця у реакції з *Bacillus stearothermophilus* нуклеотидилтрансферазою. Остаточний препарат А76 тРНК<sup>Тир</sup> було отримано після очистки ВЕРХ, препарати модифікованих 2'dA76 або 3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> було отримано шляхом елюції з гелю (рис. 3.1. в).





**Рис. 3.1.** Електрофореграми препаратів тРНК<sup>Тир</sup>. (а) Отримання ДНК-матриці з геном тРНК<sup>Тир</sup>, 1% агарозний гель: М – маркер (Gene Ruler, 1 kb), 1 – плазмідна ДНК рUC18-тРНК<sup>Тир</sup>, 2 – рUC18-тРНК<sup>Тир</sup> після рестрикції за допомогою MvaI. (б) Результат *in vitro* транскрипції (8% ПААГ+7М сечовина): М – *E. coli* тРНК<sup>Тир</sup> (5 мкг), 1 – 5 мкл транскрипту *T. thermophilus* тРНК<sup>Тир</sup>, 2 – 10 мкл транскрипту *T. thermophilus* тРНК<sup>Тир</sup>. (в) Результат очистки модифікованих препаратів тРНК<sup>Тир</sup> (8% ПААГ + 7М сечовина): 1 – транскрипт тРНК<sup>Тир</sup> (після *in vitro* транскрипції), 2 – тРНК<sup>Тир</sup> після відрізання ССА-кінця, 3 – А76 тРНК<sup>Тир</sup>, 4 – 2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup>, 5 – 3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup>

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

**3.1.2. Вивчення кінетики аміноацилювання тРНК<sup>Тир</sup> за участі L/D-Тир у присутності ТирРС.** У ході дослідження було з'ясовано кінетичні параметри реакції аміноацилювання для ТирРС *T. thermophilus in vitro* (табл. 3.1) з тРНК<sup>Тир</sup> (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. 3.1). Такий рівень помилкового включення набагато вищий, ніж повідомлялося раніше для інших АРСаз [9]. Тому помилково утворена сполука D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup>

потребує редагування додатковими факторами. Константа Міхаеліса-Ментен  $K_m$  для обох стереоізомерів у реакції аміноацилювання суттєво не відрізняється ( $3.7 \pm 0.7$  мкМ для L-Тир і  $5.3 \pm 1.0$  мкМ для D-Тир відповідно), що підтверджує подібність у розпізнаванні ТирРС та високу спорідненість обох енантіомерів Тир щодо 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 ( $9 \pm 2$  мкМ проти  $3.7 \pm 0.35$  мкМ) для L-Тир і 5.2-кратне збільшення ( $27.6 \pm 7.5$  мкМ проти  $5.3 \pm 0.5$  мкМ) для D-Тир.

Таблиця 3.1

**Стаціонарні параметри аміноацилювання для ТирРС при 60 °C<sup>1</sup>**

Тир	$k_{cat}$ (с <sup>-1</sup> )	$K_m$ (мкМ)	$k_{cat}/K_m$ (мкМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup> )	Фактор дискримінації <sup>2</sup>
Реакція пірофосфатного (АТФ-ФФ <sub>н</sub> ) обміну				
L-Тир <sup>3</sup>	$17.36 \pm 3.90$	$9 \pm 2$	1.93	1
D-Тир <sup>4</sup>	$2.20 \pm 0.65^{**}$	$27.6 \pm 7.5$	0.08 <sup>**</sup>	24
Реакція аміноацилювання				
L-Тир <sup>5</sup>	$46.7 \pm 6.7$	$3.70 \pm 0.35$	12.76	1
D-Тир <sup>6</sup>	$3.5 \pm 0.2^{**}$	$5.3 \pm 0.5$	0.66 <sup>**</sup>	19

Примітки:

1. Наведені дані представляють середні значення  $\pm$  SE (n = 3); [ТРНК<sup>Тир</sup>] = 5 кмМ, [D-Тир] знаходилася в діапазоні від 0.5 до 200 мкМ, [L-Тир] – від 0.25 до 50 мкМ. \*\* P<0.005 (One-way ANOVA) порівняно зі значеннями для L-Тир

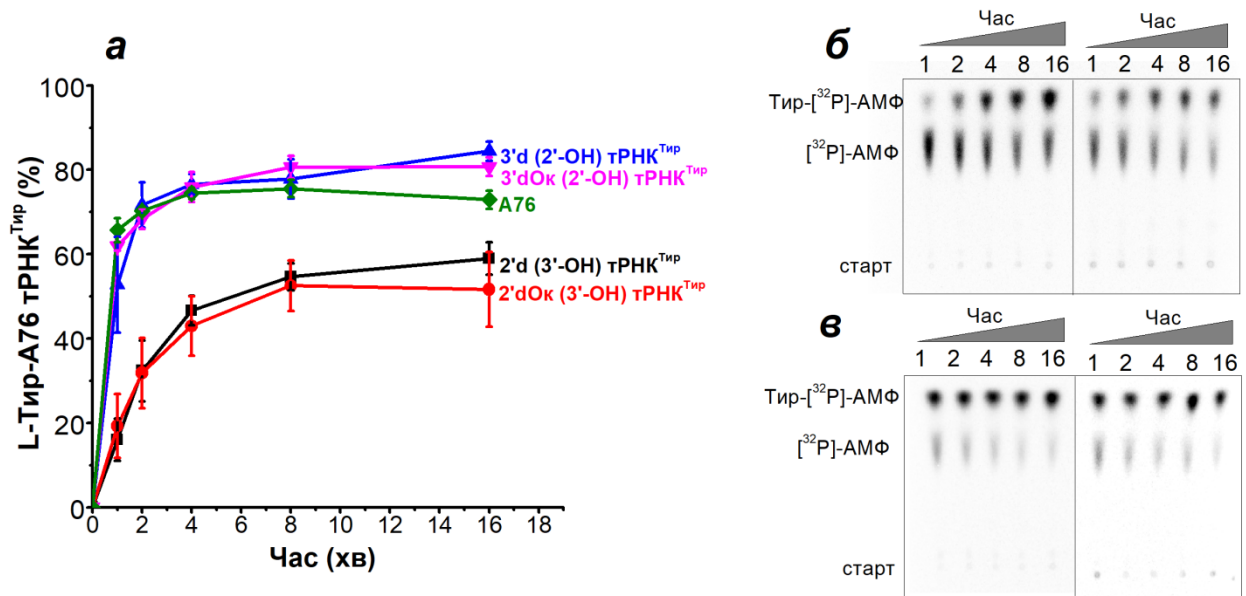
2. Фактор дискримінації =  $(k_{cat}/K_m)_{L-Тир}$  (споріднена амінокислота)/ $(k_{cat}/K_m)_{D-Тир}$  (неспоріднена)

3-6. ТирРС використовували у концентрації <sup>3</sup>5 нМ, <sup>4</sup>50 нМ, <sup>5</sup>0.05 нМ, <sup>6</sup>0.5 нМ.

Фактор дискримінації D-Тир також порівнювали з іншими ТирРС; у *Bacillus subtilis* він становить 3 [138], у *Geobacillus stearothermophilus* – 8 [143],

у *Escherichia coli* – 50 [141]. Всі вищезгадані ТирРС, включно з *Thermus thermophilus*, виявляють слабку дискримінацію D-Тир. Таким чином, наші результати мають незначні відмінності порівняно з ТирРС інших видів, що підтверджує взаємну спільну еволюцію членів класу I родини АРСаз.

**3.1.3. Визначення основних сайтів приєднання L- і D- Тир до тРНК<sup>Тир</sup>.** Щоб з'ясувати роль гідроксильних груп кінцевого аденозину тРНК<sup>Тир</sup> у приєднанні енантіомерів Тир, ми перевірили активність ТирРС на дикому типі тРНК<sup>Тир</sup> та на його 2'dA76 або 3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> похідних відповідно. Мічення похідних А76 тРНК<sup>Тир</sup> проводили шляхом відновлення усіченого варіанту тРНК<sup>Тир</sup> ферментом нуклеотидтрасферазою *Bacillus stearothermophilus* (НТаза), що додає ССА-кінцеві нуклеотиди у присутності [<sup>32</sup>P]-АТФ (або його дезокси-аналогів) та ЦТФ (детальніше див. у «Матеріали та методи»). Це дозволяє уникнути недоліків загальноживаного методу [171] – обміну термінального аденозину (А76), забезпечуючи відсутність немодифікованого залишка А76 на аналог дезокси-АТФ. Для підтвердження однорідності препаратів тРНК за структурою кінцевого аденозину ми обробили аліквоту міченої тРНК періодатом натрію (NaIO<sub>4</sub>), що призводить до окислення вільних ОН-груп рибози та втрати її акцепторної здатності. Функціональну активність тРНК до та після обробки періодатом натрію перевіряли у реакції аміноацилювання з L-Тир та ТирРС (рис. 3.2). Обробка NaIO<sub>4</sub> дикого типу тРНК<sup>Тир</sup> призводить до повної втрати її ізоакцепторної активності, а відтак слугує контролем роботи періодату. Аналогічна каталітична активність 2'dA76 або 3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> до та після обробки NaIO<sub>4</sub> (2'dA76<sub>Ок</sub> або 3'dA76<sub>Ок</sub> тРНК<sup>Тир</sup>) дозволяє припустити, що мічені дезоксиА76 варіанти тРНК не містять домішок тРНК дикого типу.



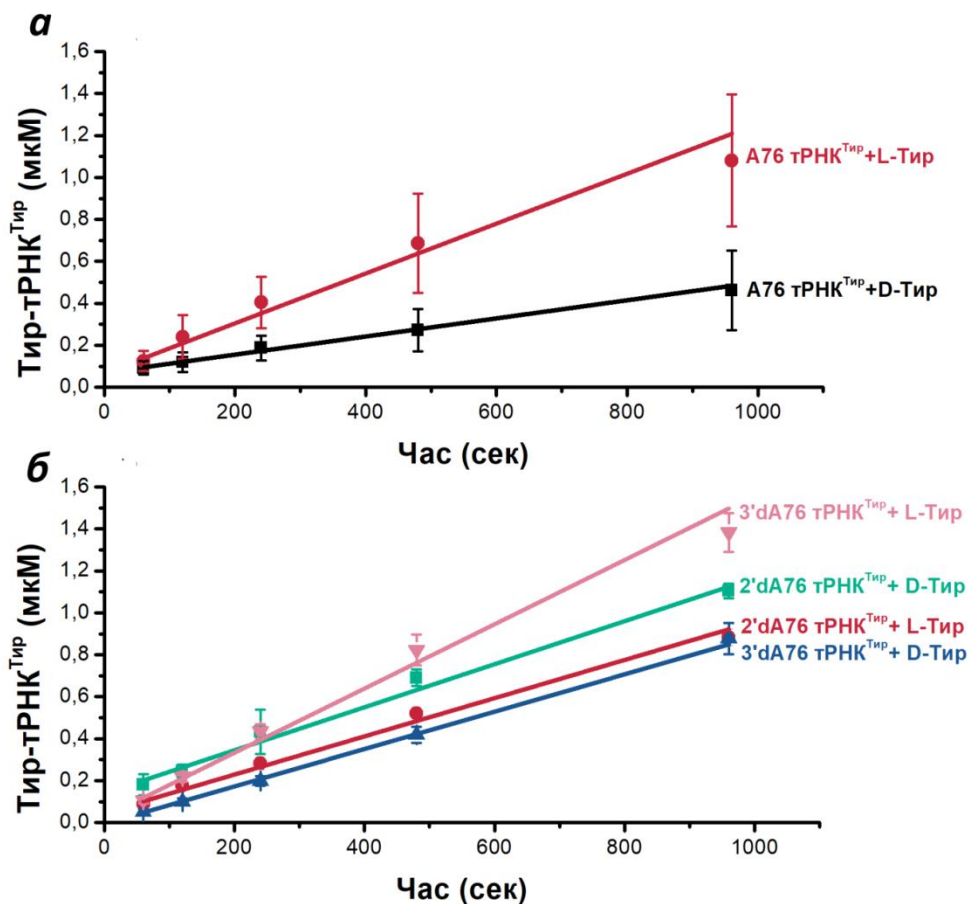
**Рис. 3.2.** Ефект окислення періодатом натрію ( $\text{NaIO}_4$ ) похідних А76 тРНК<sup>Тир</sup>: (а) аналіз кінетики аміноацилювання (10 мкМ L-Тир, 5 мкМ тРНК<sup>Тир</sup>, 100 нМ ТирРС) з 2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> та 3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> та їхніми окисленими періодатом натрію формами – 2'dA76<sub>ок</sub> тРНК<sup>Тир</sup> та 3'dA76<sub>ок</sub> тРНК<sup>Тир</sup>; (б) ТШХ (тонкошарова хроматографія) неокислених (ліворуч) та окислених 2'dA76<sub>ок</sub> субстратів (праворуч); (в) ТШХ неокислених (ліворуч) та окислених субстратів 3'dA76<sub>ок</sub> (праворуч). Дані представлені у вигляді середнього значення  $\pm$  SD від трьох незалежних експериментів

Початкові швидкості аміноацилювання ( $V_0$ ) всіх похідних тРНК<sup>Тир</sup> 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:

$$k_{obs} = \frac{V_0}{[\text{ТирРС}]}$$

Результати розрахунків спостережуваних стаціонарних констант швидкості реакції наведені у табл. 3.2 та на рис. 3.3. Обчислені каталітичні параметри показали, що за відсутності сусідньої ОН-групи L-Тир приєднується до 3'-ОН тРНК<sup>Тир</sup> (2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup>) у 6.5 разів повільніше ( $k_{obs} = 5.8 \text{ c}^{-1}$ ) порівняно з

диким типом A76 тРНК<sup>Тир</sup> ( $k_{\text{obs}} = 37.9 \text{ с}^{-1}$ ), тоді як естерифікація 2'-ОН групи (3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup>) показала збільшення вдвічі  $k_{\text{obs}}$  ( $70.8 \text{ с}^{-1}$ ). Таким чином, L-Тир переважно зв'язується з 2'-ОН групою тРНК<sup>Тир</sup>, що як правило є важливою для аміноацилювання АРСазами класу I.



**Рис. 3.3.** Початкові швидкості аміноацилювання різних субстратів тРНК<sup>Тир</sup> (A76, 2'd та 3'd) з L/D-Тир. Використовувалися насичуючі концентрації субстратів:  $[\text{тРНК}^{\text{Тир}}] = 5 \text{ мкМ}$  та  $[\text{L/D-Тир}] = 100 \text{ мкМ}$ . (а)  $[\text{ТирРС}]$  для L-Тир становило 0,05 нМ, для D-Тир – 0.1 нМ. (б)  $[\text{ТирРС}]$  для 2'dA76 + L-Тир було 0.25 нМ, для 2'dA76 + D-Тир – 500 нМ, для 3'dA76 + L-Тир – 0.025 нМ, для 3'dA76 + D-Тир – 0.05 нМ. Дані представлені у вигляді середнього значення  $\pm$  SD із трикратних повторів

При аміноацилюванні з D-Тир,  $k_{\text{obs}}$  для 3'dA76 в 6 разів вище порівняно з A76 тРНК<sup>Тир</sup> (табл. 3.2); в свою чергу  $k_{\text{obs}}$  для 2'dA76 демонструє 467-кратне зниження каталітичної константи ( $0,006 \text{ с}^{-1}$ ) порівняно з A76 тРНК<sup>Тир</sup>. Здатність

D-Тир зв'язується з 3'-ОН групою тРНК<sup>Тир</sup> достатньо низька, що дозволяє припустити, що 2'-гідроксильна група тРНК<sup>Тир</sup> є також основним місцем приєднання D-Тир. Таким чином, спостерігається асиметрія приєднання D-Тир до тРНК<sup>Тир</sup>, тоді як відмінності в аміноацилюванні по 2' та 3'-ОН групах L-Тир виявилися незначними.

Результати експериментів з L- та D-Тир узгоджуються з правилом аміноацилювання для АРСаз класу I, де амінокислоти в основному приєднуються до 2'-ОН груп кінцевої рибози тРНК. Отже, вони також доповнюють попередні структурні прогнози з літературних джерел [21], підтверджуючи «подвійний» характер розпізнавання тРНК<sup>Тир</sup> ТирРС.

Таблиця 3.2

**Спостережені константи швидкості реакцій аміноацилювання тРНК<sup>Тир</sup> та її 2' і 3'-дезоксипохідних у присутності ТирРС за стаціонарних умов при 60°C<sup>1</sup>**

Тир та тРНК <sup>Тир</sup>	$k_{obs}$ (с <sup>-1</sup> )	$k_{obs}(с^{-1})_{L-Тир, A76} / k_{obs}(с^{-1})$	$k_{obs}(с^{-1})_{D-Тир, A76} / k_{obs}(с^{-1})$
L-Тир, A76 <sup>2</sup>	37.9 ± 5.4	1	0.07**
D-Тир, A76 <sup>3</sup>	2.8 ± 0.4	13.5**	1
L-Тир, 2'd <sup>4</sup>	5.8 ± 0.5	6.5**	—
D-Тир, 2'd <sup>5</sup>	0.0060 ± 0.0009	—	466.7**
L-Тир, 3'd <sup>6</sup>	70.8 ± 5.9	0.54*	—
D-Тир, 3'd <sup>7</sup>	16.8 ± 2.3	—	0.17**

Примітки:

1. Дані представлені у вигляді середніх значень ± SE (n = 3); у реакції використовували насичуючі концентрації тРНК<sup>Тир</sup> (5 мкМ) та L/D-Тир (100 мкМ). \* 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.

2-7. Фермент тестували за концентрацій <sup>2</sup>0.05 нМ, <sup>3</sup>0.5 нМ, <sup>4</sup>0.25 нМ, <sup>5</sup>500 нМ, <sup>6</sup>0.025 нМ, <sup>7</sup>0.05 нМ.

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

**Результати досліджень, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

1. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O. P., Tukalo M. A. (2018) The Dual Role of the 2'-OH Group of A76 tRNA<sup>Tyr</sup> in the Prevention of D-tyrosine Mistranslation. *Journal of molecular biology*, 430 (17), 2670-2676. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.06.036.

2. **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.

3. **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. – *Acta biochimica polonica*, Vol. 63, Suppl., 1/2016. – P. 43.

4. **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. – *FEBS journal* 2017, 284, P. 293-294. DOI: 10.1111/febs.14174.

5. **Rybak M. Yu.** (2018 May) The role of 2'- and 3'-hydroxyl groups of A76 tRNA<sup>Tyr</sup> at the first steps of translation quality control. – Conference of Young Scientists “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology”, 23-25 May 2018, Kyiv. – *Ukr. Biochem. J.*, 2018, Vol. 90, № 3, P.133.

6. **Rybak M. Yu.,** Tukalo M. A. (2018 September) Chirality during protein biosynthesis: the role of hydroxyl groups of tRNA<sup>Tyr</sup> 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. – *Ukr. Biochem. J.*, 2018, Vol. 90, Special Issue, P. 145.

7. **Rybak M. Yu.,** Kovalenko O., Tukalo M. (2018 September) The dual role of the 2'-OH group of A76 tRNA<sup>Tyr</sup> in the discrimination of D-Tyrosine during the first steps of translation. – 27<sup>th</sup> tRNA Conference, 23-28 September 2018, Strasbourg, France. – *Abstract book*, P.186.

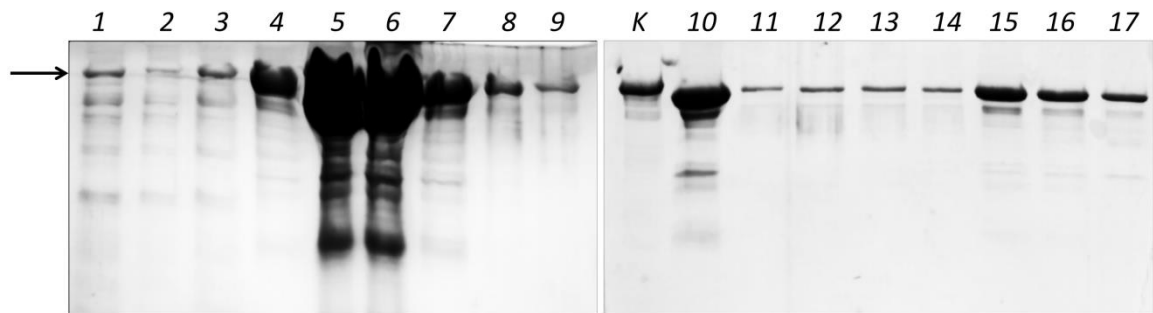
### 3.2. Отримання рекомбінантної АлаРС *T. thermophilus*

**3.2.1. Експресія та очищення повнорозмірної АлаРС *T. thermophilus* з С-кінцевою полігістидиновою міткою та її характеристика.** Раніше у відділі ензимології білкового синтезу ІМБГ було отримано генно-інженерні конструкції АлаРС без Гіс-мітки та з нею, а також показано, що під час експресії та очистки білка без Гіс-мітки спостерігалася його швидка деградація, що не виявляла жодної залежності від хроматографічного носія та буферного складу розчинів. Припускалося, що коротка форма АлаРС з'являлася в зв'язку з існуванням нестабільних ділянок С-кінцевого домену білка, що призводило до пошкодження та вкорочення цільового фермента. Це питання, мабуть, є основною причиною того, чому дотепер не було отримано кристалічну структуру АлаРС, незважаючи те, що перші повідомлення про очищення білка зі штаму *T. thermophilus* HB8 з'явилися більше 20 років тому [48].

Щоб подолати проблему з деградацією АлаРС без Гіс-мітки, ген АлаРС було переклоновано з додаванням Гіс-мітки в С-термінальну частину протеїну. Варто зауважити, що це підвищило стійкість білка до 90%. На першому етапі очищення (афінна хроматографія на Ni-NTA-Sepharose) спостерігалось лише близько 5-10% деградованої АлаРС (рис. 3.4).

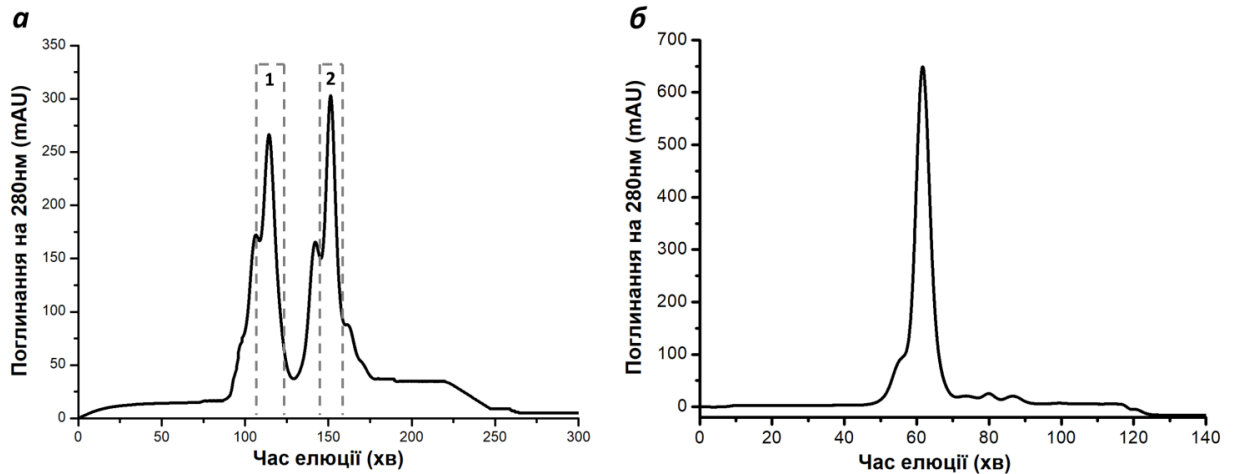


АлаРС(6хГіс) пробували елюювати за градієнтом імідазолу, за різних концентрацій NaCl та  $\beta$ -меркаптоетанолу в лізисному буфері, з додаванням ще одного етапу очищення після афінної колонки (DEAE-Sepharose), однак всі ці спроби не допомогли усунути первинного (близько 10%) рівня деградації білка. Тим не менш, співвідношення не збільшувалося після діалізу протягом ночі та другого етапу хроматографії (гель-фільтрації на Superdex 200) (рис. 3.5). Профіль елюції АлаРС на колонці для гель-фільтрації представлений на рис. 3.5 (*a* – конструкція без Гіс-мітки, *б* – з С-кінцевою 6хГіс-міткою). Профіль елюції Гіс-АлаРС (рис. 3.5. *б*) разом із профілями елюції маркерних білків використовували для визначення молекулярної маси фермента (MW).



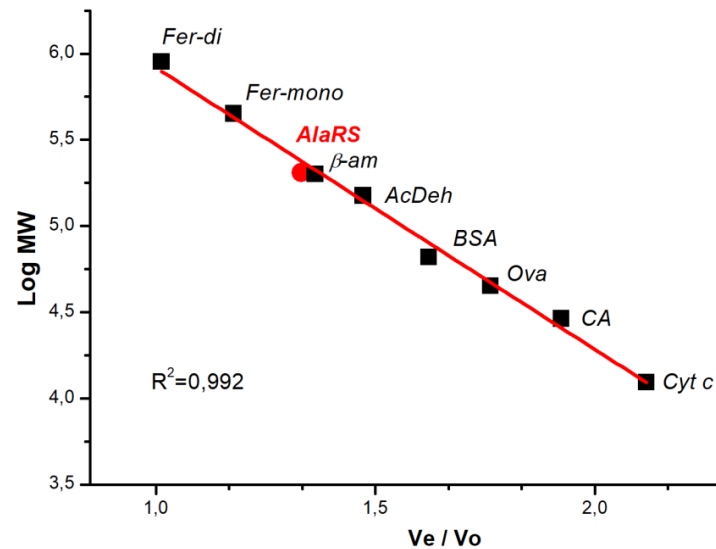
**Рис. 3.4.** Процедура двоступеневого очищення АлаРС(6хГіс): К – контроль, ЛейРС *Mycobacterium tuberculosis* (107 кДа); 1 – лізат, завантажений на колонку з Ni-NTA-Sepharose; 2 – фракція білків, що не зв'язалася з Ni-NTA; 3 – фракція промивки колонки; 4-9 – пікові фракції елюції; 10 – комбінований елюат після діалізу, завантажений на колонку для гель-фільтрації Superdex 200, 11-17 – фракції на гель-фільтраційній колонці (1-7 відповідно)

Варто зауважити, що міграція АлаРС(6хГіс) у денатуруючому ПААГ практично співпадала з міграцією ЛейРС *Mycobacterium tuberculosis* (107 кДа), що свідчить про відсутність агрегації та протеолізу отриманого препарату білка. Розрахункова молекулярна маса (~100 кДа) за ПААГ збігається з теоретично розрахованою для мономерної форми.



**Рис. 3.5.** Очищення АлаРС методом гелі-фільтрації на колонці Superdex S 200: *а* – профіль елюції для АлаРС зі швидкістю потоку 0,5 мл/хв (1 – повнорозмірний білок, 2 – його вкорочена форма); *б* – для АлаРС (6xHis) зі швидкістю потоку 1 мл / хв

Теоретично розрахована MW відповідної мономерної структури білка становила 97.48 кДа. Експериментально розрахована MW становила 204.2 кДа, підтверджуючи димерну форму АлаРС. Калібрувальна крива показана на рис. 3.6. Загальна кількість очищеного білка становила  $\approx 1,5$  мг з 1 л бактеріальної культури ( $\sim 4,2$  г осаду клітин). Таким чином, наші результати узгоджуються з літературними даними [48], однак нам вдалося досягти більшої стабільності рекомбінантного білка за рахунок додавання полігістидинової послідовності до С-кінця.

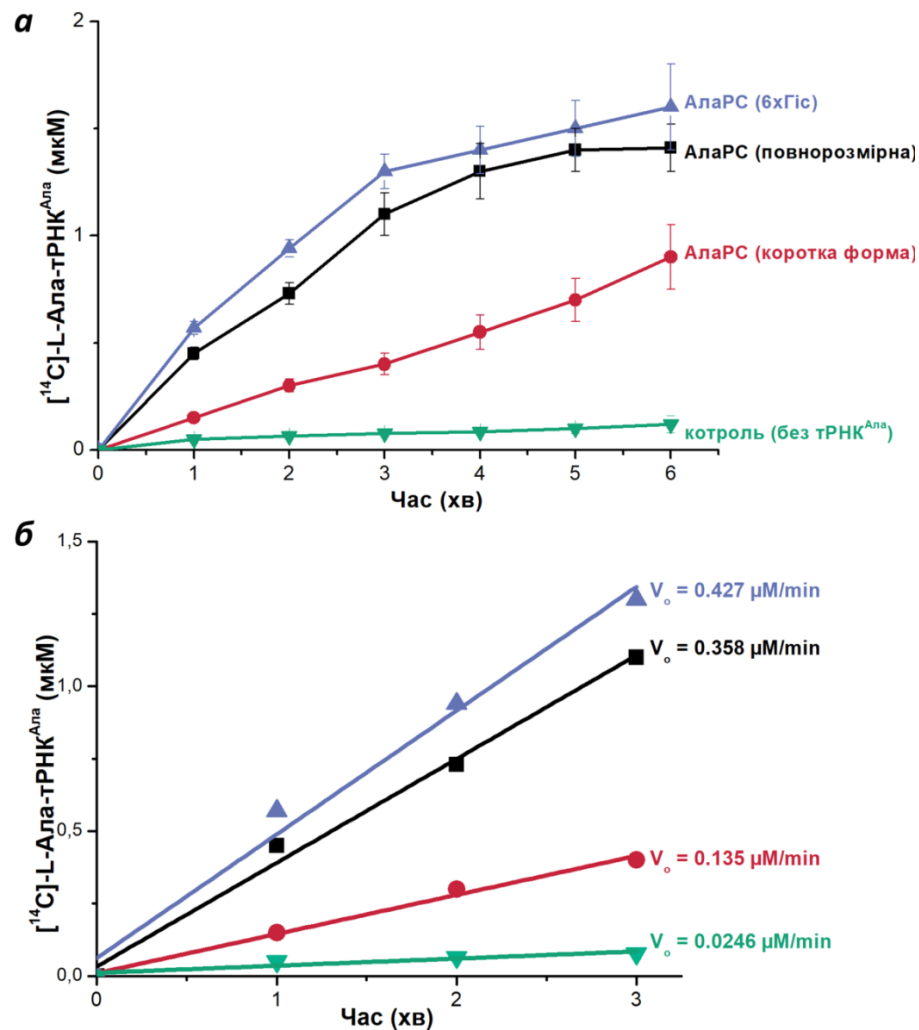


**Рис. 3.6.** Визначення молекулярної маси АлаРС за допомогою гель-фільтрації на колонці Superdex S 200 (Fer-di – димер феритину; Fer-mono – мономер феритину; β-A – β-амілаза; Cat – каталаза; AcDeh – алкогольдегідрогеназа; BSA – альбумін бичачої сироватки; Ova – яєчний альбумін; AlaRS – аланіл-тРНК синтетаза; CA – карбоангідраза; Cyt.c – цитохром с)

**3.2.2. Активність очищеної АлаРС в реакції аміноацилювання.** Всі очищені ферменти (АлаРС та АлаРС(6хГіс)) були перевірені у реакції аміноацилювання з тотальною *E. coli* тРНК і радіоактивноміченим [<sup>14</sup>C]-L-Ала (рис. 3.7. а). Варто зазначити, що вкорочена форма АлаРС мала лише в 2.5 рази меншу початкову швидкість порівняно з повнорозмірним білком. Натомість АлаРС(6хГіс) продемонструвала лише в 1.2 рази вищу початкову швидкість порівняно з повнорозмірною АлаРС без полігістидинової послідовності (рис. 3.7. б). Таким чином, можна зауважити, що каталітичний домен АлаРС (С-Ала) працював належним чином.

Таким чином, рекомбінантний білок АлаРС(6хГіс) успішно експресували в *E. coli* і очистили до однорідності без домішок деградованих форм. АлаРС(6хГіс) була використана для подальших досліджень

ферментативної кінетики для з'ясування механізмів активації та редагування неспоріднених амінокислот.



**Рис. 3.7.** Кінетика синтезу Ала-тРНК<sup>Ала</sup> за участі АлаРС. (а) Аміноацилювання за участі АлаРС та АлаРС(6xГіс). (б) Початкові швидкості утворення аміноацил-тРНК<sup>Ала</sup>. [АлаРС] = 50 нМ. Деталі експерименту описані в розділі «Методи»

### Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в роботі:

1. **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.

### 3.3. Каталітичні властивості АлаРС *T. thermophilus*

#### 3.3.1. Активація споріднених та неспоріднених амінокислот АлаРС.

Будучи представниками різних класів АРСаз, ТирРС та АлаРС можуть мати різну специфічність щодо D-амінокислот. На відміну від ТирРС, АлаРС має кращі можливості для контролю точності у процесі трансляції: 1) центральний домен редагування [38], гомологічний домену редагування класу II АРСаз – ТреРС [176]; 2) вільні білки AlaX (AlaXps) (типи Ia, Ib, II або AlaX-S, AlaX-M і AlaX-L, що існують у вигляді малих (S), середніх (M) і великих (L) формах відповідно) [118, 177], що діють на тРНК (тРНК<sup>Ала</sup> або тРНК<sup>Тре</sup> [177]), помилково заряджені Сер або Глі. Необхідність кількох *транс*- та *цис*-редагувальних факторів для АлаРС обумовлена високою частотою помилкової активації неспоріднених амінокислот (Глі, Сер).

Ми дослідили здатність АлаРС активувати D-Ала та D-Сер та порівняли її з активацією інших амінокислот – L-Ала, L-Сер та Глі (табл. 3.3). У випадку АлаРС *T. thermophilus* порівняно з L-Ала, значення  $k_{cat}$  зменшилося в 38 разів, а  $K_m$  збільшилося в 16 разів для D-Ала, що вказувало на те, що ферменту потрібно більше субстрату для досягнення напів-насичення. На відміну від цього, показник  $k_{cat}$  для Глі ( $6.5 \pm 1.6 \text{ c}^{-1}$ ) схожий на такий для L-Ала ( $7.88 \pm 2.6 \text{ c}^{-1}$ ). Значення для L-Сер зменшилося в 3 рази (на  $2.3 \pm 0.8 \text{ c}^{-1}$ ) порівняно з L-Ала. D-Сер показав найнижчу каталітичну ефективність: показник  $k_{cat}$  знизився в 62 рази, в той час як  $K_m$  продемонстрував 2930-кратне збільшення, що ілюструє надзвичайно низьку спорідненість субстрату. 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. 3.3).

Кінетичні параметри АлаРС в реакції АТФ-ФФ<sub>н</sub> обміну<sup>1</sup>

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

## Примітки:

1. Дані представляють середні значення ± SE (n = 3), обчислені в реакції АТФ-ФФ<sub>н</sub> 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 <sup>3</sup>15 нМ, <sup>4</sup>1 мкМ, <sup>5</sup>100 нМ, <sup>6</sup>2.5 мкМ.

Крім того, ми перевірили нашу гіпотезу щодо активації D-амінокислот іншими АлаРС з добре вивченою мутантною формою фермента АлаРС (С666А) *E. coli* (табл. 3.4), що є практично неспроможною до редагування помилково утворені субстрати з Глі та Сер. Аналогічні показники були отримані для АлаРС (С666А) *E. coli* (табл. 3.4): 107-кратна втрата ефективності для L-Сер, 207 для Глі, 333 для D-Ала і 67 400 для D-Сер.

**Кінетичні параметри активації амінокислот за участі АлаРС  
(С666А) *E. coli*<sup>1</sup>**

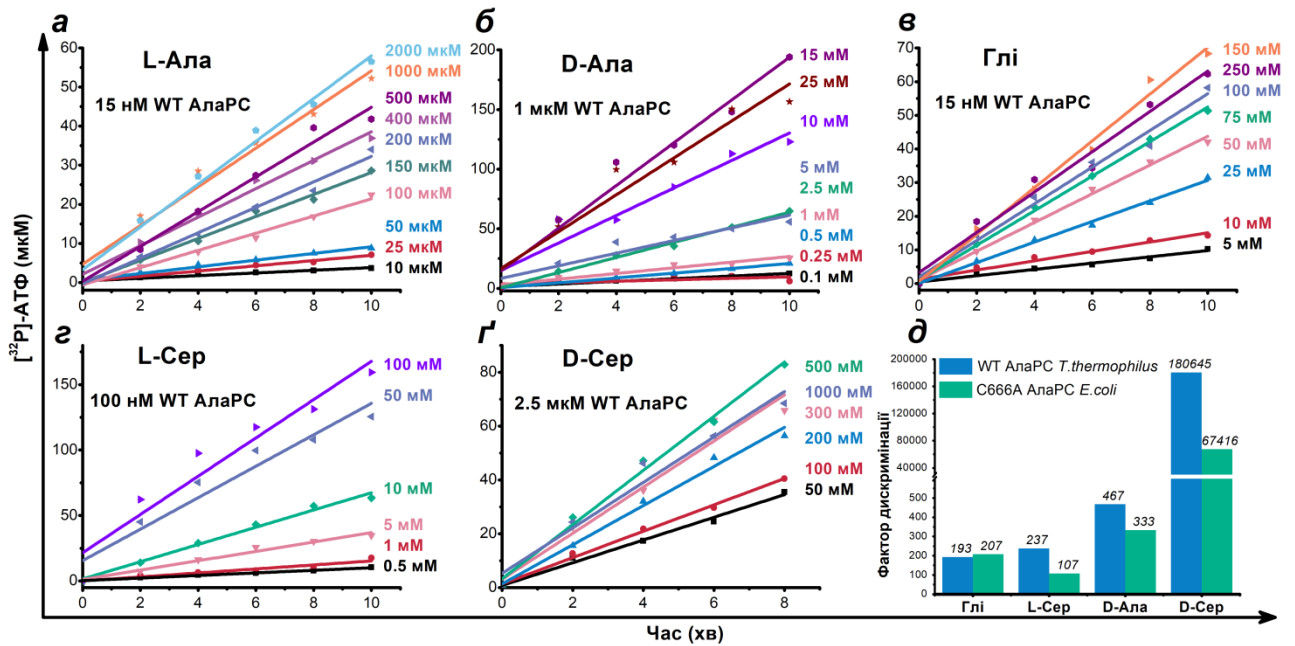
Аміно кислота	$k_{cat}$ (с <sup>-1</sup> )	$K_m$ (мМ)	$k_{cat} / K_m$ (мМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup> )	Фактор дискримінації
L-Ала <sup>2</sup>	0.18 ± 0.04	0.304 ± 0.043	0.6	1
D-Ала <sup>3</sup>	0.1 ± 0.04	60 ± 20	1.8 × 10 <sup>-3</sup>	333
Глі <sup>4</sup>	0.47 ± 0.16	182.5 ± 60	2.9 × 10 <sup>-3</sup>	207
L-Сер <sup>5</sup>	0.147 ± 0.04	27 ± 6	5.6 × 10 <sup>-3</sup>	107
D-Сер <sup>6</sup>	0.0046 ± 0,00007	517 ± 160	8.9 × 10 <sup>-6</sup>	67 416

Примітки:

1. Дані представляють середні значення ± SE (n = 3), обчислені в реакції АТФ-ФФ<sub>н</sub> обміну при 37 °С (рН 7.5). [L-Ала] була в діапазоні концентрацій від 10 мкМ до 4 мМ, [D-Ала] – від 2 мМ до 1 М, [Глі] – від 0.5 мМ до 1 М, [L-Сер] – від 5 мМ до 1М, [D-Сер] – від 50 мМ до 1 М. Концентрації L-/D-Ала, Глі, L-/D-Сер варіювали в діапазоні 0.03-13  $K_m$  (L-Ала), 0.03-17  $K_m$  (D-Ала), 0.03-6  $K_m$  (Глі), 0.19-19  $K_m$  (L-Сер) та 0.1-1.9  $K_m$  (D-Сер). Найвища концентрація D-Ser (1.9  $K_m$ , 1М) була обмежена його низькою розчинністю.

2-6. АлаРС (С666А) використовували у концентрації <sup>2</sup>250 нМ, <sup>3</sup>5 мкМ, <sup>4</sup>300 нМ, <sup>5</sup>2.5 мкМ та <sup>6</sup>10 мкМ.

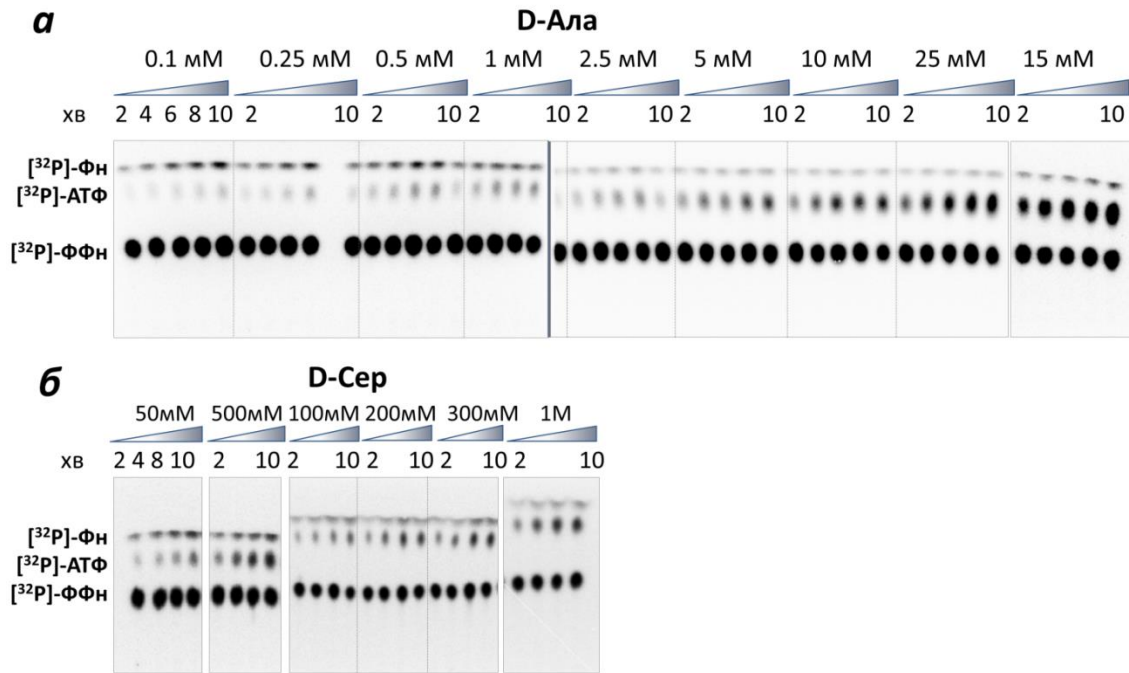
Кінетичні криві пірофосфатного обміну для АлаРС *T. thermophilus* показані на рис. 3.8.



**Рис. 3.8.** Кінетика активації амінокислот в реакції АТФ-ФФ<sub>н</sub> обміну. Активація L-Ала (а), D-Ала (б), Глі (в), L-Сер (г), D-Сер (д); рівні специфічності субстрату (фактор дискримінації), обчислені для АлаРС *T. thermophilus* (сині стовпці) та АлаРС (С666А) *E. coli* (зелені стовпці) (д). Праворуч від графіків а–г вказані відповідні концентрації амінокислот

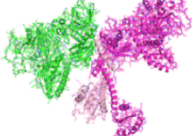
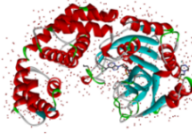
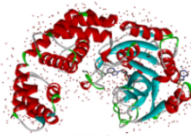
Оригінальні ТШХ-пластини, що засвідчують вперше виявлену нами активацію D-Ала та D-Сер за допомогою АлаРС, показані на рис. 3.9.





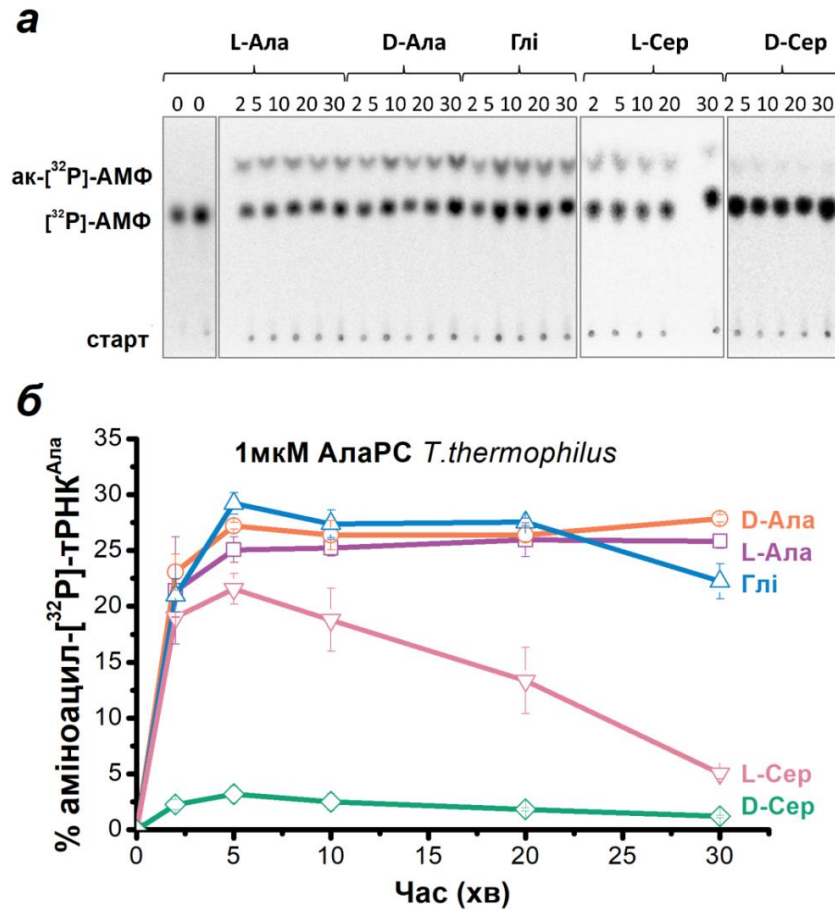
**Рис. 3.9.** Аналіз методом ТШХ (TLC) реакції АТФ-ФФ<sub>н</sub> обміну для (а) D-Ала (1 мкМ АлаРС) і (б) D-Сер (2,5 мкМ АлаРС)

Порівняння наших даних з літературними засвідчують загальну тенденцію помилкової активації амінокислот для трьох випадків (рис. 3.10).

			
	<b>АлаРС</b> ( <i>T. thermophilus</i> )	<b>C666A АлаРС</b> ( <i>E. coli</i> )	<b>АлаРС (<i>E. coli</i>)</b> (Tsui and Fersht, 1981)
<b>Глі</b>	<chem>NC(=O)O</chem> 1/193	1/207	1/238
<b>D-Ала</b>	<chem>C[C@@H](N)C(=O)O</chem> 1/467	1/333	—
<b>L-Сер</b>	<chem>OC[C@H](N)C(=O)O</chem> 1/237	1/107	1/500
<b>D-Сер</b>	<chem>C[C@@H](N)C(=O)O</chem> 1/180 645	1/67 416	—

**Рис. 3.10.** Показники каталітичної ефективності для неспоріднених амінокислот, що помилково активуються АлаРС *T. thermophilus* та АлаРС (С666А) *E. coli* (поточні дослідження, реакція пірофосфатного обміну) порівняно з літературними даними (Tsui, W.-C. and Fersht, A.R. (1981))

**3.3.2. АлаРС помилково аміноацилює тРНК<sup>Ала</sup> за допомогою D-Ала та D-Сер.** У сукупності з літературними даними попередніх досліджень про АлаРС ми не знайшли достатньо доказів щодо фактичних показників швидкості аміноацилювання з усіма неспорідненими субстратами. Тому, ми провели реакції аміноацилювання з L-Ала, Глі, L-Сер, D-Ала і D-Сер і перевірили потенційну можливість приєднання D-Ала і D-Сер до [<sup>32</sup>P]-тРНК<sup>Ала</sup>. Цікаво, що з очищеною нативною тРНК<sup>Ала</sup> ми спостерігали подібну акцепторну активність тРНК<sup>Ала</sup> (приблизно 30% аміноацил-тРНК) для трьох амінокислот: спорідненої L-Ала та неспоріднених Глі та D-Ала (рис. 3.11. б). На рис. 3.11. а показана ТШХ-пластина, що демонструє хід аміноацилювання [<sup>32</sup>P]-тРНК<sup>Ала</sup> 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<sup>Ала</sup> (10 мкМ тРНК<sup>Ала</sup>), були насичуючими. Рівень аміноацильованої L-Сер-тРНК<sup>Ала</sup> знижувався з 20% (5 хв) до 5% (30 хв) протягом реакції. Ці дані можуть свідчити про високий рівень деацилювання АлаРС щодо Сер-тРНК<sup>Ала</sup>, що також є високим для синтетази *E. coli* [38, 174]. Аналогічний стаціонарний рівень Ала-тРНК спостерігався під час аміноацилювання з тРНК, що виявляє подвійну специфічність Фен/Ала-тРНК (YFA2) АлаРС *E. coli* [178]. На відміну від спостережень для АлаРС *E. coli* [178], додавання неорганічної пірофосфатази не впливало на рівень аміноацильованої тРНК<sup>Ала</sup> *T. thermophilus*. Таким чином, наші результати відображають стан рівноваги між швидкістю аміноацилювання та деацилювання, що каталізується АлаРС *T. thermophilus*.



**Рис. 3.11.** Акцепторна активність нативної тРНК<sup>Ала</sup> 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-[<sup>32</sup>P]-АМФ та [<sup>32</sup>P]-АМФ. (б) Графічне зображення даних ТШХ, показаних на рисунку а

Кінетичні параметри синтезу аміноацил-тРНК визначали для L-Ала, D-Ала та Глі. На відміну від значень 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. 3.5). 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<sup>Ала</sup>, а отже, високу потребу в гідролізі помилково ацильованих тРНК.

Таблиця 3.5

**Кінетичні параметри аміноацилювання за участі АлаРС<sup>1</sup>**

Амінокислота	$k_{\text{cat}}$ (с <sup>-1</sup> )	$K_m$ (мМ)	$k_{\text{cat}}/K_m$ (мМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup> )
L-Ала <sup>2</sup>	0.86 ± 0.22	0.086 ± 0.020	10
D-Ала <sup>3</sup>	0.003 ± 0.0002	27.35 ± 8.01	0.00011
Глі <sup>4</sup>	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 [<sup>32</sup>P]-тРНК<sup>Ала</sup> при 60 °С (рН 7.5).

2-4. АлаРС використовували у концентрації <sup>2</sup>15 нМ, <sup>3</sup>1 мкМ та <sup>4</sup>100 нМ.

**3.3.3. Вивчення загального рівня редагування за участі АлаРС.**

Поряд із посттрансферним редагуванням, яке відбувається в спеціальному домені редагування АРСази, фермент може безпосередньо гідролізувати неспоріднений аміноацил-аденілат через вбудований механізм такого редагування у каталітичному сайті. Щоб вивчити внесок пре- та посттрансферного редагування, ми перевірили АлаРС в тестах накопичення [<sup>32</sup>P]-АМФ з L-Ала, D-Ала, Глі, L-Сер і D-Сер. Передбачувано, що для всіх субстратів переважали шляхи редагування, залежні від тРНК (рис. 3.12). тРНК-незалежне редагування для L-Ала становило приблизно 1%, для D-Ала (50 мМ та 500 мМ відповідно) – від 2 до 16 ± 6%. Аналогічні показники – орієнтовно 18 ± 4% спостерігалися для Глі та 3 ± 0.7% – для 50 мМ L-Сер. 10 ± 2% тРНК-незалежного редагування спостерігалось як для L-Сер, так і для D-Сер (500 мМ).



Отже, тРНК<sup>Ала</sup> має важливе значення для точного редагування помилково зв'язаних амінокислот, що передбачає можливість переважного посттрансферного шляху редагування D-аланіну за участі АлаРС. З іншого боку, слабка тРНК-незалежна активність АлаРС (ймовірно, пре-трансферне редагування) може пояснюватись тим, що абсолютно консервативний залишок W160 (Trp160), діючи в якості щита, захищає карбоксил аміноацил-аденілатів від нуклеофільної атаки та гідролізу за участі молекул води (з результатів молекулярної динаміки АлаРС з D-Сер та D-Ала-аденілатами [179]). Однак вкрай важливими є подальші дослідження для з'ясування співвідношення швидкостей тРНК-залежного та тРНК-незалежного шляхів редагування за участі АлаРС.

**Результати досліджень, представлені у цьому підрозділі, опубліковані у наступних роботах:**

1. **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.

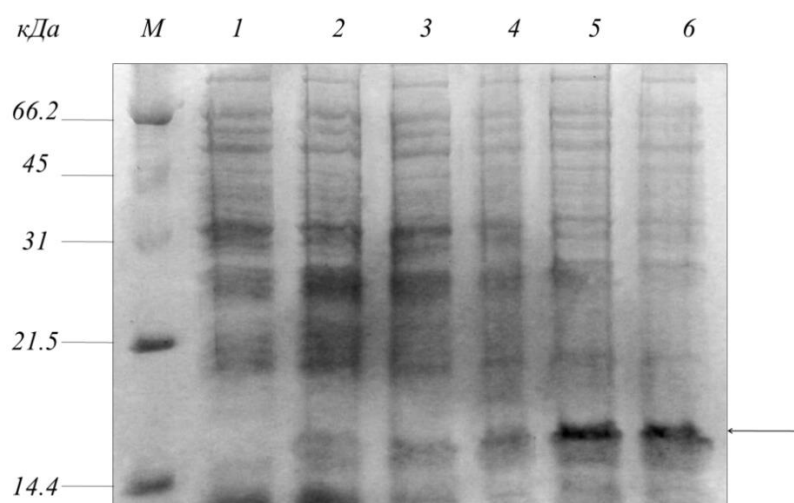
2. **Rybak M. Yu., Rayevsky A. V., Tukalo M. A.** (2019 October) Establishing of the chiral selectivity in translation apparatus: the role of *cis*- and *trans*-editing factors. – XII Ukrainian biochemical congress, devoted 165-anniversary to I. Ya. Gorbachevskyi, 30 September-4 October 2019, Ternopil. – *Medical and Clinical Chemistry*, Vol. 21. – №3 (Supplement). – P. 43-44.

### **3.4. Клонування, експресія та очищення ДТД *T. thermophilus* (ДТД)**

**3.4.1. Створення ДТД-експресуючої конструкції та експресія рекомбінантного білка в різних середовищах.** Раніше співробітниками відділу ензимології білкового синтезу було проведено спроби експресувати ген

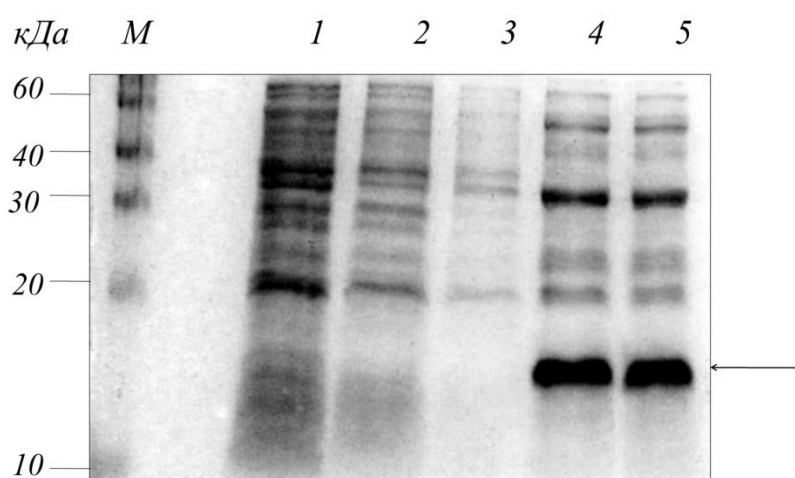
ДТД *T. thermophilus* у векторах pET15b, pET28b та pET29b (під контролем T7-промотору та лак-оператора), але ці експерименти виявили низький рівень експресії цільового білка навіть після 24 год IPTG-індукції (неопубліковані дані). Щоб подолати цю проблему, ми вирішили обрати вектор із ProEX™ HT прокаріотичної системи для експресії – pProEXHTb (4778 п.о.) – що має Tgc-промотор, вбудовану 6xГіс послідовність на N-кінці протеїну та сайт для TEV-протеази для подальшого відщеплення 6xГіс. Було показано, що pProEXHTb виробляє велику кількість цільових білків за короткий час індукції з Tgc-промотора [180].

Рівень експресії ДТД в клітинах *E. coli* BL21(DE3)pLysS перевіряли в різних концентраціях IPTG та в декількох середовищах (LB, TB, P, 2xTY). Найкращими отриманими умовами були такі: 4-5 год індукції 0.6 mM IPTG при 37 °C у TB середовищі (рис. 3.14). Ці умови надалі були використані для препаративної експресії ДТД.



**Рис. 3.14.** Експресія ДТД в TB середовищі. 15% ПААГ в денатуруючих умовах розчинних білкових екстрактів BL21(DE3)pLysS: М – білковий маркер (стандарт для ПААГ, Low Range 6-200 «Bio-Rad»); 1 – екстракт з неіндукованих бактерій; 2-6 – екстракти через 1-5 год індукції 0.6 mM IPTG. Положення (6xГіс)ДТД позначено стрілкою

**3.4.2. Очищення Гіс-ДТД.** Першим етапом очищення (6xГіс)ДТД була афінна хроматографія на Ni-NTA. Результат представлений на рис. 3.15. Фермент, елюйований із колонки 400 мМ імідазолом, містив домішки білків з більшою молекулярною масою. Промивання колонки буфером, доповненим 20 мМ імідазолом, дещо підвищувало чистоту ДТД, але знижувало її вихід. Крім того, промивання колонки 1 М NaCl не суттєво зменшувало кількість домішок (дані не показані). А відтак, нам не вдалося покращити якість препарату ДТД після цього етапу очищення.

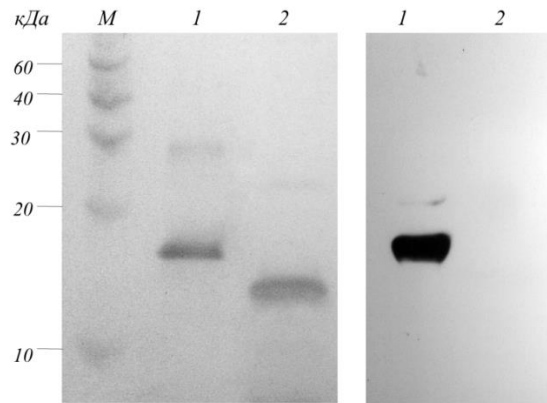


**Рис. 3.15.** Очищення (6xГіс)ДТД на колонці з Ni-NTA. 15% ПААГ в денатуруючих умовах: М – білковий маркер (Roti-Mark 10-150 «Roth», Німеччина); 1 – розчинний білковий лізат; 2 – фракція, що не зв'язалася з Ni-NTA; 3 – промивання колонки; 4 – об'єднані фракції елюції з ДТД; 5 – (6xГіс)ДТД після діалізу. Положення (6xГіс)ДТД на гелі позначено стрілкою

Для видалення полігістидинової послідовності з ферменту (6xГіс)ДТД було використано рекомбінантну TEV-протеазу за протоколом, описаним в «Матеріалах та методах». Ефективність відщеплення перевіряли за допомогою ПААГ в денатуруючих умовах та Вестерн-блот аналізу з анти-Гіс антитілами (рис. 3.16). Відсутність сигналу на доріжці 2 панелі Вестерн-блоту підтверджувала повне видалення полігістидинової послідовності з ДТД. Крім

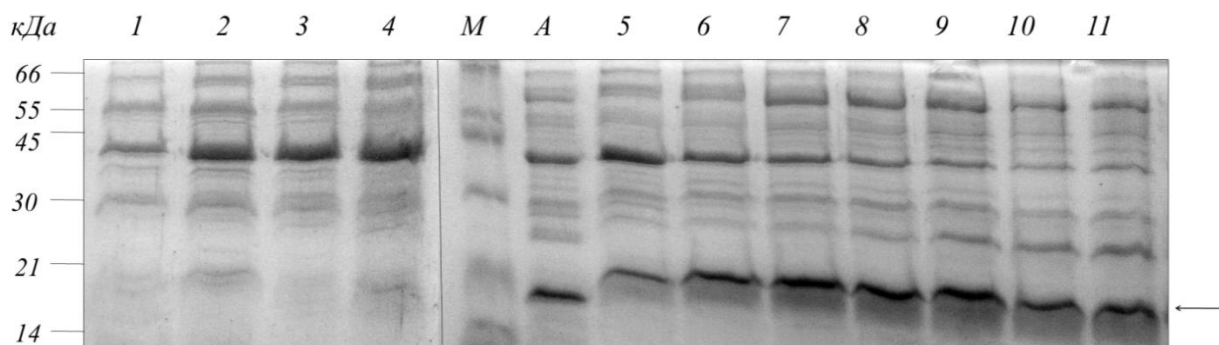


того, добре помітним був також зсув у міграції ДТД на ПААГ в денатуруючих умовах (доріжка 2, ліва панель) після обробки TEV-протеазою. Отже, відщеплення Гіс-мітки від Гіс-ДТД можна просто контролювати за допомогою ПААГ в денатуруючих умовах.



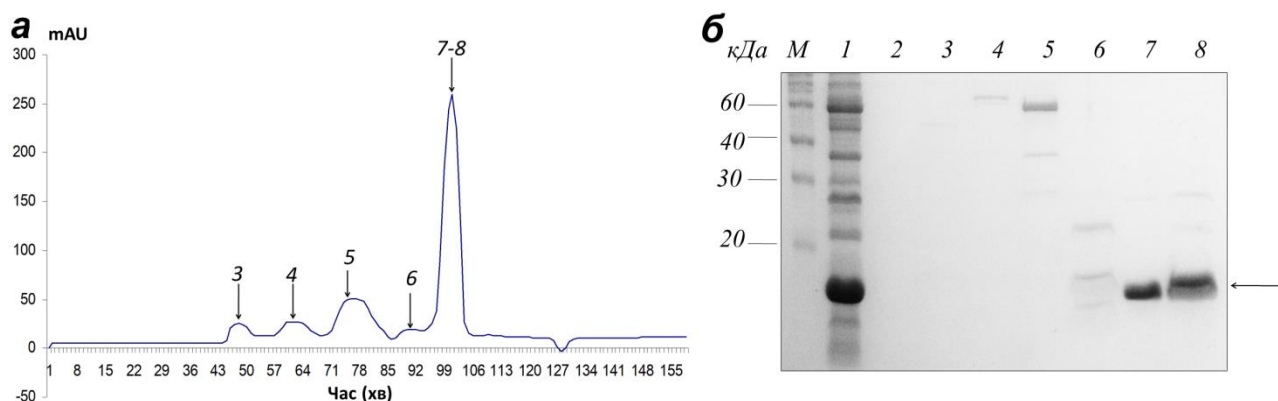
**Рис. 3.16.** 15% ПААГ в денатуруючих умовах (ліва панель) та Вестерн-блот аналіз (права панель) аналізу (6xГіс)ДТД до (1) та після (2) обробки TEV-протеазою

Варто зазначити, що співвідношення  $A_{260}/A_{280}$  ДТД після афінної хроматографії та відщеплення полігістидинової послідовності становило приблизно 1.0, що свідчило про наявність домішок нуклеїнових кислот. Для видалення фрагментів нуклеїнових кислот було застосовано аніонообмінну хроматографію. Однак під час цього етапу ми не змогли позбутися забруднення білками, присутніми в препараті ДТД. Ми застосовували різні лінійні градієнти (від 0 до 1 М NaCl та від 50 мМ до 800 мМ NaCl), але це не покращило якість препарату ДТД. Остаточо було використано градієнт від 200 до 800 мМ NaCl (як описано в «Матеріалах та методах»), який дозволив нам позбутися залишок нуклеїнових кислот та деяких білків. Після етапу очищення на колонці з Q-Sepharose Fast Flow, ДТД мав типове співвідношення  $A_{260}/A_{280} = 0.5-0.6$ . Гель-електрофорез фракцій елюції з Q-сефарозної колонки, представлений на рис. 3.17. Пікові фракції елюції об'єднували та діалізували, потім концентрували на 10 кДа Centricon до 10-12 мг/мл.



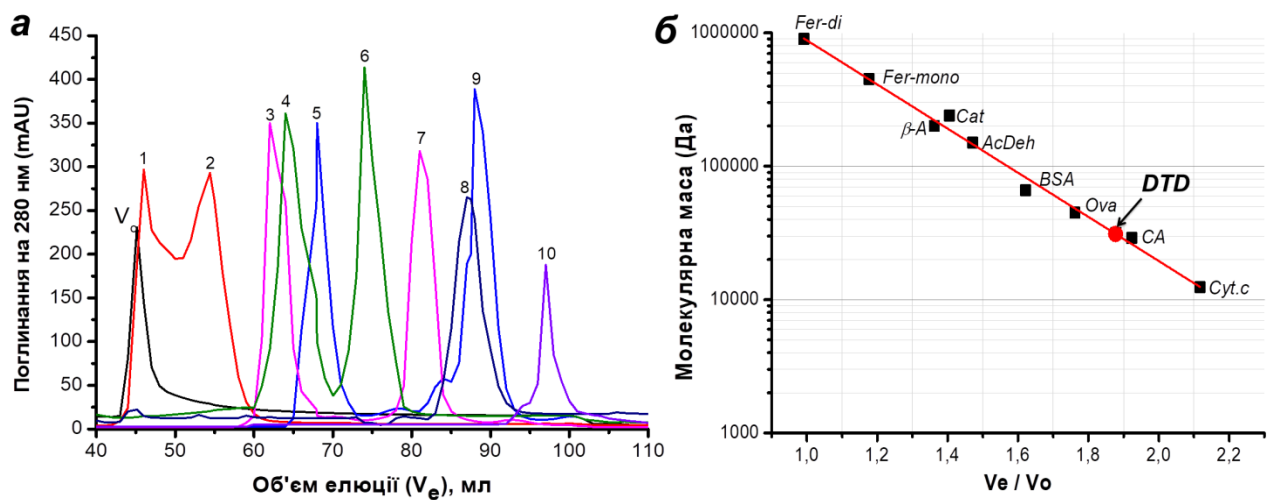
**Рис. 3.17.** 15% ПААГ в денатуруючих умовах фракцій після хроматографії на Q-сефарозі: М – білковий маркер (RPN 58100, «Amersham»); А – білок, завантажений на колонку; доріжки 1-11 – фракції, отримані під час градієнтної елюції з Q-сефарозної колонки. Положення ДТД на гелі позначено стрілкою

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. 3.18. *а*. Згідно з профілем елюції, ДТД було ефективно відокремлено від інших білків та елюйовано з колонки єдиним піком (рис. 3.18. *а*). Відповідно до ПААГ в денатуруючих умовах (рис. 3.18. *б*), чистоту ДТД можна оцінити як понад 90%.



**Рис. 3.18.** Очищення ДТД методом гель-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; 2 – порожня доріжка; доріжки 3-8 – відповідні фракції, отримані після гель-фільтрації. Положення ДТД позначено стрілкою

**3.4.3. Визначення молекулярної маси D-аміноацил-тРНК деацилази *T. thermophilus* в нативних умовах.** Молекулярна маса деацилази була отримана шляхом порівняння об'єму її елюції на колонці Superdex S 200 з об'ємом елюції білків з відомою молекулярною масою (рис. 3.19. а). Об'єм елюції ( $V_e$ ) ДТД на Superdex S 200 становив 11 мл. Індекс  $V_e/V_0$  для ДТД був розрахований як 1.888. Відповідно до калібрувальної кривої (рис. 3.19) молекулярну масу ДТД оцінювали як 32 кДа. Зважаючи на амінокислотну послідовність гена ДТД (152 а.к. залишків), його теоретично розрахована молекулярна маса становить 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. 3.19.** Визначення молекулярної маси ДТД за допомогою гель-фільтрації на колонці Superdex S 200. (а) профіль елюції маркерних білків та ДТД. (б) калібрувальна крива білків (Fer-di – димер феритину; Fer-mono – мономер феритину;  $\beta$ -А –  $\beta$ -амілаза; Cat – каталаза; AcDeh – алкогольдегідрогеназа; BSA – альбумін бичачої сироватки; Ova – яєчний альбумін; ДТД – D-аміноацил-тРНК-деацилаза; CA – карбоангідраза; Cyt. c – цитохром с). Положення ДТД позначено червоним колом

Отже, в ході роботи рекомбінантну D-аміноацил-тРНК деацилазу з *T. thermophilus* клонували в вектор 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. За даними гель-фільтрації рекомбінантна ДТД скоріш за все є димером у розчині.

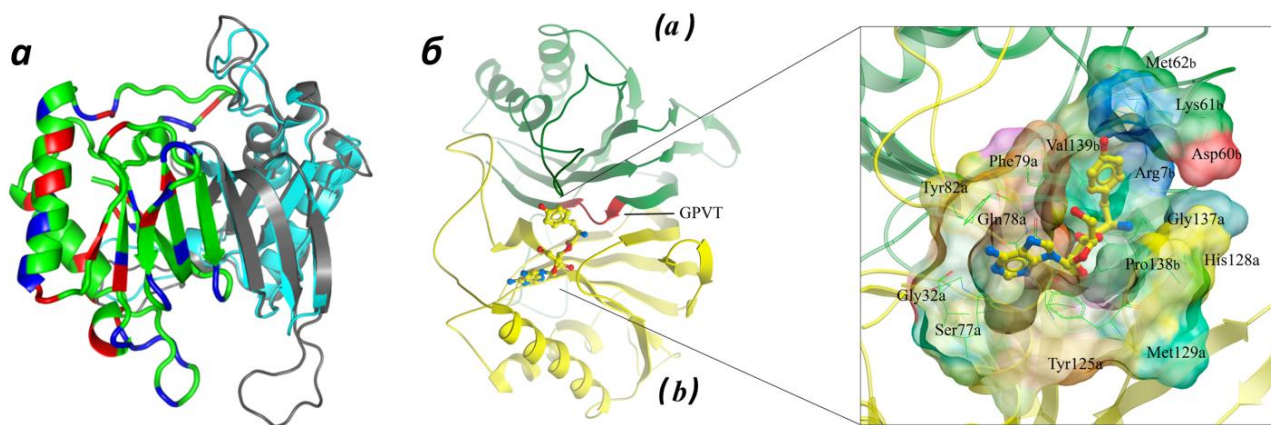
**Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в таких роботах:**

1. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Kryklyvyi I., Tukalo M. (2015) Cloning, expression and purification of D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>-deacylase from *Thermus thermophilus*. *Biopolymers & Cell*, 31 (3), 179-186. DOI: 10.7124/bc.0008DE.
2. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2014 October) Cloning, expression and purification of D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>-deacylase (DTD) from *Thermus thermophilus*. – Materials of XI Ukrainian biochemical congress, 6-10 October 2014, Kyiv. – *Ukr. Biochem. J.*, 2014, Vol.86, №5 (Suppl. 1), P.74-75.
3. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O. P., Kriklyvyi I. A., Tukalo M. A. (2015 May) Cloning, expression and purification of D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>-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. – *Biopolymers and Cell*, 2015, 31 (Special Issue), P.9.
4. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2015 September) D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>-deacylase from *Thermus thermophilus* (DTDDT): cloning, expression, purification and detection of editing activity. – International Conference of the Young Scientists (CYS-2015), 21-25 September, Kyiv. – *Abstract book*, P. 40.

### 3.5. Визначення амінокислотних залишків, які входять до структури активного центру ДТД методом сайт-спрямованого мутагенезу

Сайт-спрямований мутагенез активного сайту фермента дає можливість з'ясувати потенційну роль амінокислотних залишків у його коректному функціонуванні. Дані комп'ютерного моделювання та молекулярної динаміки (у разі відсутності кристалічної структури білка) є вихідними для пошуку таких залишків. Широковідомий метод Ала-сканування (заміни амінокислотного залишку фермента на аланін) використовували у мутагенезі для аналізу структурно-функціональних особливостей активного сайту ДТД.

**3.5.1. Вибір амінокислотних залишків для сайт-спрямованого мутагенезу деацилази.** Оскільки кристалічна структура ДТД залишається нез'ясованою, для моделювання механізму редагування *T. thermophilus* ДТД та пошуку амінокислотних залишків в активному сайті колегою з відділу ензимології білкового синтезу (н.с. Раєвським О. В.) було виконано МД симуляцію з D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> у комплексі з ферментом. Перед цим, реконструкція димеру ДТД була проведена у два етапи на основі результатів множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей та пошуку просторового шаблону для моделювання мономеру та димеру. Пошук у BLAST виявив достатній рівень подібності (51-52% ідентичності) між амінокислотними послідовностями цільового білка *T. thermophilus* (Q5SJK9) та його ортологів – ДТД з *Aquifex aeolicus* (O66742), *E. coli* (P0A6M4) та *Plasmodium falciparum* (Q8IIS0), взятих з бази даних UniProt [181]. Вирівнювання послідовностей цих білків щодо послідовності цільового білка демонструвало дещо інший розподіл однакових (ідентичних) залишків щодо повнорозмірної послідовності (рис. 3.20. a). Варто зазначити, що, незважаючи на рівномірно розподілені однакові залишки обох послідовностей шаблонів уздовж цільового білка; сайт зв'язування ДТД *T. thermophilus* з аміноацил-тРНК знаходиться набагато ближче до такого в ДТД *E. coli* (рис. 3.20. a).

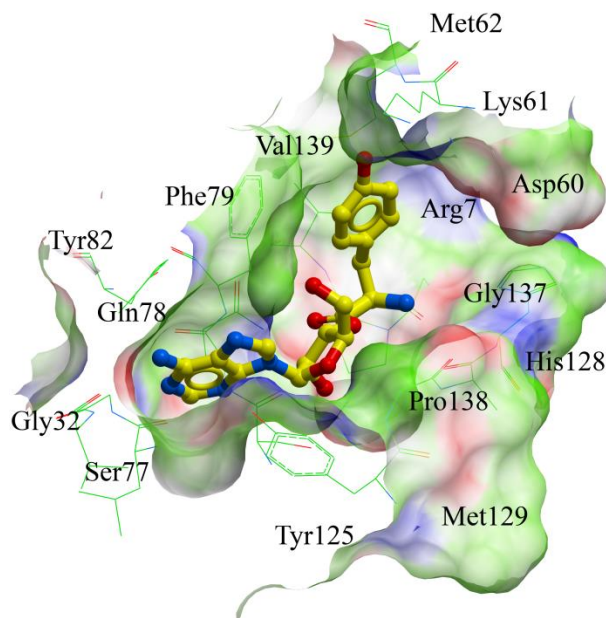


**Рис. 3.20.** (а) Гомологічне моделювання структури ДТД. На передньому плані субодиноця ДТД *T. thermophilus*, забарвлена відповідно до ступеня ідентичності між цільовою ДТД та наявними структурами (3KNF, 1JKE): ділянки, які є однаковими для всіх трьох білків, позначені зеленим кольором; ті, що є спільними лише з ДТД *P. falciparum* показані темно-синім, а ті, які є спільними з ферментом *E. coli*, показані червоним. Орієнтація другої субодиноці (сірого кольору) ДТД з *T. thermophilus* аналогічна відповідній субодиноці з *P. falciparum* (блакитного кольору). (б) Деталі змодельованого активного центру ДТД після 5 нс симуляцій МД – амінокислотне оточення аміноацил-тРНК, сформоване з обох ланцюгів ДТД. Ділянка GPVT, яка відповідає за енантіоселективність, забарвлена червоним кольором (PyMol 1.5)

Координати кристалічних структур білків, наявних в базі даних білків (PDB) (PDB ID: 2DBO з роздільною здатністю 2,76 Å та 1JKE з роздільною здатністю 1,55 Å відповідно) були використані як шаблони для реконструкції 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 *T. thermophilus* був сформований за допомогою гомологічного моделювання по шаблону 3KNF. Сайт зв'язування ДТД сформований двома паттернами: з амінокислотних залишків першої субодиноці – 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. 3.21). Симуляції МД апо-ферменту було проведено для підтвердження якості змодельованої структури.

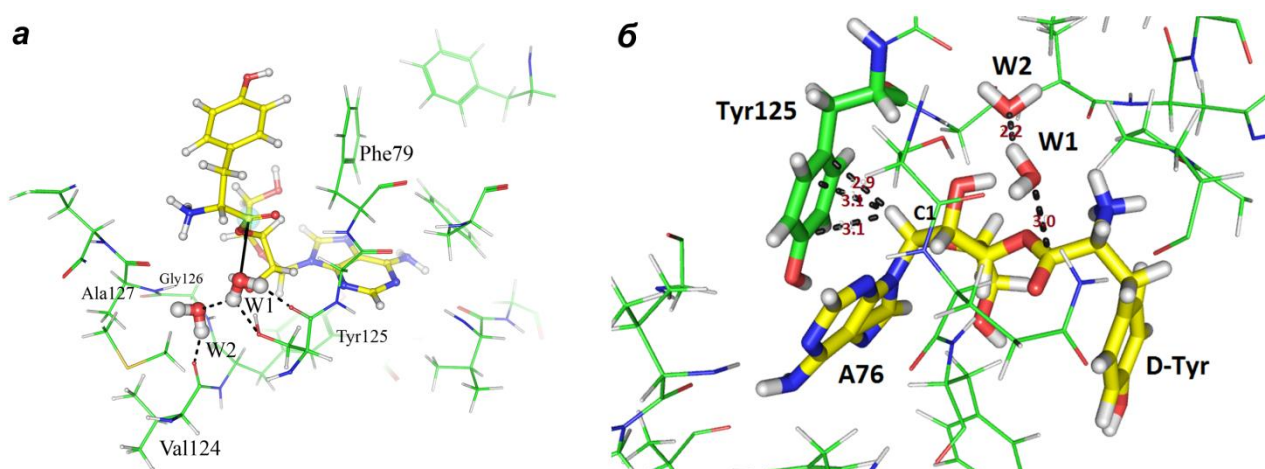


**Рис. 3.21.** Структурна організація активного центру ДТД *T. thermophilus* після симуляцій МД

Як відомо, найважливішими взаємодіями для фіксації ліганду є стекінгова взаємодія та Н-зв'язки для пуринової основи та міцний Н-зв'язок для аміногрупи. Було виявлено, що найкраща конформація частини ліганду D-тирозил-A76 утворює розгалужену мережу Н-зв'язків з Val33, Phe79, Tyr125, Gly126, Ala127, His128, Glu137 та Pro138, а також Т- та паралельно-зміщений стекінг з парою Phe79/Tyr125. Незважаючи на незахищеність полярного гідроксифенільного кільця, воно показало більш високі показники та нижчі значення рівня внутрішньої деформації. Цей білково-лігандний комплекс став початковою координатною структурою для наступних симуляцій МД як білка дикого типу, так і його мутантних форм (рис. 3.20. б).

Симуляції МД димеру ДТД *T. thermophilus* дозволили дослідити умови, необхідні для успішної атаки молекулою води карбонільного атома. Для визначення попереднього проміжного стану, який був би придатний для

обчислень квантової механіки (QM), всі молекули води оцінювались по відстані та куту відносно площини карбоксильної групи (рис. 3.22. а). Таким чином, кадри МД, де дві молекули води формували необхідний кут  $104\text{--}105^\circ$  на відстані менше  $3,5 \text{ \AA}$  від атома вуглецю карбоксильної групи, спостерігалися для кожних 200-300 пс всієї траєкторії. Для обчислень була обрана найбільш прийнятна структура зупиненої динаміки, що відповідає 1370 пс МД, оскільки необхідна міжмолекулярна геометрія підтримувалася протягом періоду в 50 пс (рис. 3.22. а, б).



**Рис. 3.22.** Передреакційний комплекс ДТД з субстратом. (а) Вирівнювання трьох основних стійких геометрій із достатньою відстанню та кутом між молекулами води та реакційноздатним центром D-тирозил-тРНК. Н-зв'язки показані у вигляді пунктирних ліній; забарвлені червоним – між лігандами і білками, чорним – для позначення водних містків. Напрямок ймовірної нуклеофільної атаки також зображений на рисунку суцільною чорною лінією. (б) Загальний вигляд активного центру ДТД *T. thermophilus*, що показує ван-дер-Ваальсову взаємодію між Y125 та C1 рибозою A76 (чорні пунктирні лінії показують відстані (Å) між C1 рибозою A76 та кільцем Y125). W1 і W2 – атакуюча та асистуюча молекули води

**3.5.2. Отримання мутантних форм ДТД.** Сайт-спрямований мутагенез гена ДТД проводили за допомогою методу QuickChange™, розробленого Stratagene (La Jolla, США). Результати були перевірені секвенуванням ДНК



отриманих клонів. Список праймерів, що використовувалися для створення мутантних форм ДТДТТ, представлений у табл. 2.1 (у розділі «Матеріали і методи»).

В результаті симуляцій МД після 5 нс (рис. 3.20. б) та порівняння послідовностей ДТД (рис. 3.23) ми вибрали кілька амінокислот для перевірки запропонованої моделі активного центру ДТД.

	10	80	120	130	140
<b><i>Escherichia coli</i> (1-145)</b>	MIALIQRVTRASVTVEG	GSVLVVSQFTLAAD	-NTQTGRFAADMQVSLVND	GPVT	FWLQ
<b><i>Thermus thermophilus</i> (1-152)</b>	MRAVVQRVSEAFVEVEG	GEVLLVVSQFTLYAD	VHVETGVYGAHMRVHLVND	GPVT	LFLD
<b><i>Plasmodium falciparum</i> (1-164)</b>	MRVVIQRVKGAILSVRK	YELLIVVSQFTLFGN	DKIKIKKFGNYMNIDVTND	GPVT	IYID
<b><i>Danio rerio</i> (1-207)</b>	MKAIIQRVTRASVTVEG	LEVLCVVSQFTLQC-	ELIKDKKFGAKMQVLIQND	GPVT	IQLE
<b><i>Xenopus tropicalis</i> (1-207)</b>	MRAVIQRVTRASVTVGD	YEVLCVVSQFTLQC-	ELIQDKKFGAYMQVNIQND	GPVT	IELE
<b><i>Gallus gallus</i> (1-207)</b>	MKAIVQRVQAASVTVGG	YEVLCVVSQFTLQC-	ELIKDKKFGAYMQVHIQND	GPVT	IELE
<b><i>Mus musculus</i> (1-209)</b>	MKAVVQRVTRASVTVGG	YEVLCVVSQFTLQC-	ELIRDKKFGAYMQVHIQND	GPVT	IELE
<b><i>Homo sapiens</i> (1-209)</b>	MKAVVQRVTRASVTVGG	YEIILCVVSQFTLQC-	PELIKDKKFGAYMQVHIQND	GPVT	IELE

**Рис. 3.23.** Множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей ДТД з *E. coli*, *T. thermophilus*, *P. falciparum*, *D. rerio*, *X. tropicalis*, *G. gallus*, *M. musculus*, *H. sapiens*, проведеного за допомогою CLUSTAL O (1.2.4) <http://www.clustal.org/omega/>

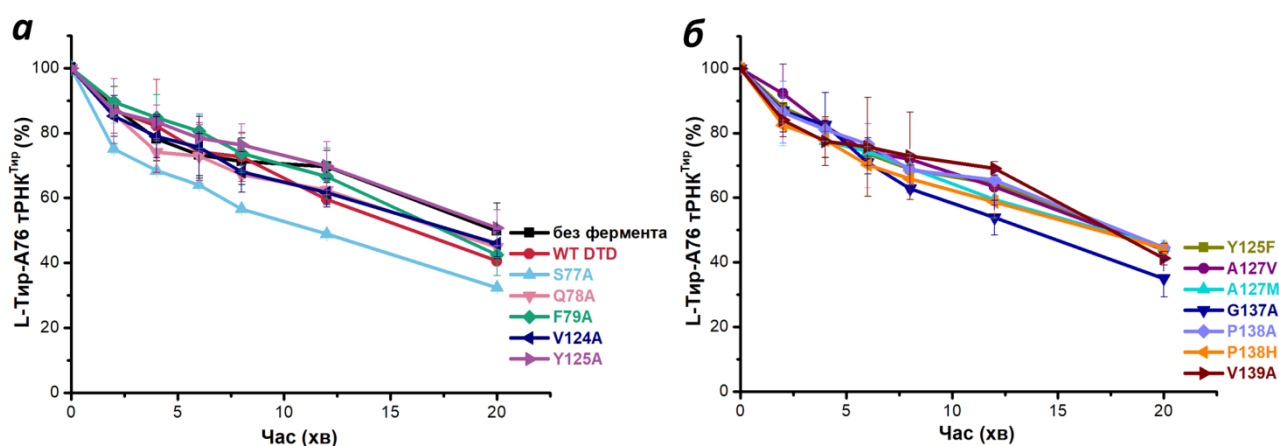
Шість відібраних амінокислот розташовувались у двох висококонсервативних ділянках (рис. 3.23); (1) SFQL-мотиві (S77, Q78 та F79) та (2) консервативному енантіоселективному GPVT-мотиві (G137, P138, V139) [158]. V124 та A127 були обрані з огляду на їхню можливу роль у позиціонуванні чи активації молекули води, знайденої в нашій моделі (рис. 3.20. б). Крім того, ми модифікували 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.

Експресію та очистку мутантних форм проводили за тим самим протоколом, що й для ДТД дикого типу. Чистоту отриманих препаратів

перевіряли за допомогою ПААГ в денатуруючих умовах. Для всіх мутантних форм вона становила більше 90%. Концентрацію білків визначали методом Бредфорд, як описано в протоколі до Bradford Reagent («Sigma»).

**3.5.3. Аналіз редагувальної активності мутантних форм ДТД щодо помилково аміноацильованих D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup>.** Для оцінки стереоспецифічності мутантних ДТД щодо D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> та L-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> 0.25 мкМ субстрату (у концентрації  $\ll K_m$ ) інкубували з 250 нМ фермента при 37 °С протягом 20 хв.

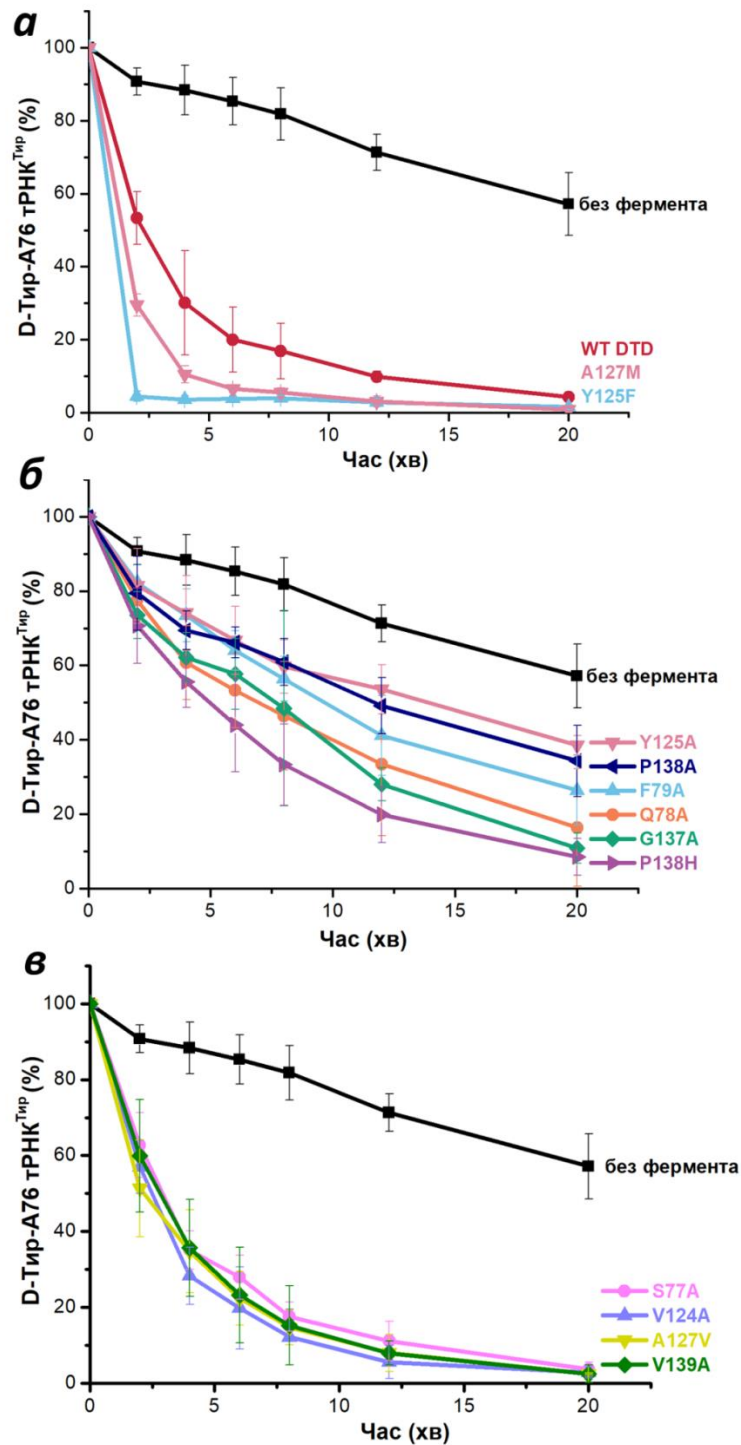
Варто зауважити, що всі мутантні форми ДТД відзначалися відсутністю гідролітичної активності щодо L-Тир-тРНК<sup>Тир</sup>, що свідчить про їхню стійку енантіоселективність (рис. 3.24). Темпи гідролізу D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> мутантними формами ДТД порівнювали зі швидкістю гідролізу ДТД дикого типу (WT).



**Рис. 3.24.** Перевірка активності деацильовання субстратів L-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> за допомогою мутантних ДТД. Концентрація L-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> становила 0.25 мкМ, ДТД – 250 нМ. Дані представлені як середнє значення  $\pm$  SD з трьох повторів

Отримані дані біохімічних тестувань дозволили розділити мутантні форми на три групи залежно від їхньої гідролітичної активності: (а) мутантні білки з підвищеною активністю (Y125F, A127M); (б) мутантні білки зі зниженою активністю (Q78A, F79A, Y125A, G137A, P138A, P138H); та (в)

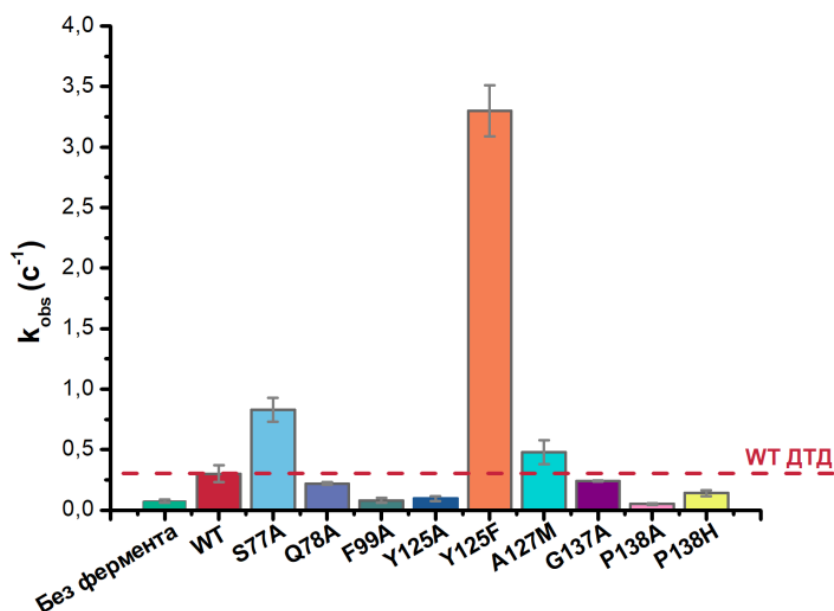
мутантні білки з тією ж активністю, що і WT ДТД (S77A, V124A, A127V, V139A) (рис. 3.25).



**Рис. 3.25.** Деацилювання D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> мутантними формами ДТД *T. thermophilus*: *а* – мутантні білки з підвищеною активністю порівняно з ДТД дикого типу; *б* – зі зниженою активністю; *в* – з тією ж активністю, що і WT ДТД. [D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup>] = 0.25 мкМ, [ДТД] = 250 нМ. Дані представлені у вигляді середнього значення ± SD від трьох незалежних експериментів

Для визначення стаціонарних констант швидкості гідролізу D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> мутантними ДТД білків ( $k_{obs}$ ) ми провели деацилювання з високими концентраціями D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> (3 мкМ) та 200 нМ ферментом. Константи ( $k_{obs}$ ) визначали за формулою:  $k_{obs} = \frac{V_o(hydrolysis)}{[ДТД]}$ .

Результати представлені на рис. 3.26. 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 базується на більш високій гідрофобності фенілаланінового кільця порівняно з тирозином. Фенільне кільце F125 знаходиться у ван-дер-Ваальсовому контакті з гідрофобним краєм рибози в положенні C1 у A76 (рис. 3.22. б), 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 [182].



**Рис. 3.26.** Гідроліз D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> у присутності WT ДТД та його мутантних форм при 37 °С. Швидкості деацилювання для 3 мкМ D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> вимірювали за допомогою 200 нМ WT ДТД та його замісних мутантних форм. Показані дані представляють середні значення ± SD (n = 3)

Кінетичні параметри ферментативної реакції для ДТД (WT) та її мутантної форми Y125F ( $k_{cat}$  і  $K_m$ ) визначалися з графіку Міхаеліса-Ментен за допомогою програми OriginPro 8.5 і представляли середні значення трьох незалежних вимірювань. Визначивши каталітичні константи ( $K_m$  і  $k_{cat}$ ) для WT ДТД та його мутанта Y125F, ми виявили збільшення його каталітичної швидкості в 273 рази (табл. 3.6), тоді як суттєвої різниці у значеннях  $K_m$  ( $1.12 \pm 0.27$  мкМ в деацилюванні з WT і  $1.7 \pm 0.4$  мкМ – з Y125F) не спостерігалось. Виходячи з цих даних, ми припускаємо, що залишок F, який є консервативним в активному центрі більшості ДТД, бере участь у механізмі деацилювання. Можливо, Y125 (як і F125) також є важливим учасником стабілізації перехідного стану.

Таблиця 3.6

**Кінетичний аналіз деацилювання D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> за допомогою WT ДТД та Y125F мутанта**

ДТД*	$k_{cat}$ (с <sup>-1</sup> )	$K_m$ (мкМ)	$k_{cat}/K_m$ (мкМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup> )	Зростання активності (рази)
WT	$0.37 \pm 0.01$	$1.12 \pm 0.27$	0.33	1.0
Y125F	$101 \pm 26$	$1.7 \pm 0.4$	59.4	273.0

Примітка: \*Швидкість деацилювання вимірювали при 100 нМ WT ДТД та 0,5 нМ Y125F ДТД; концентрації D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> варіювали в межах від 0.025 до 6 мкМ. Дані представлені у вигляді середніх значень  $\pm$  SD (n = 3)

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 та Y125A) або є відповідальними за енантіоселективність (G137A та P138A) – призводили до зниження активності деацилювання від трьох до шести разів. З іншого боку, ми не знайшли амінокислотних залишків ДТД *T. thermophilus*, чий бічні ланцюги

були б потенційними кандидатами для безпосередньої участі в реакції гідролізу. Варто зауважити, що Gly-Pro мотив обох мономерів, що формують активний сайт димерного фермента, відіграє центральну роль у механізмі розпізнавання субстратів D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup>:  $\alpha$ -аміногрупа D-Тир взаємодіє з карбонільним атомом Оксигену Gly цього мотиву. Карбонільні атоми Оксигену Gly та Pro формують водневі зв'язки з аміногрупою та С $\beta$ -атомом субстрату відповідно, тим самим посилюючи зв'язування D-аміноацилу в кишені ДТД [160]. Такий механізм розпізнавання бічного ланцюга D-амінокислоти деацिलाзою дає змогу зрозуміти, як природа створила єдиний фермент для боротьби з різними D-аміноацил-тРНК, вирішальну роль в роботі якого відіграють слабкі водневі зв'язки у селекції D-енантіомерів.

WT ДТД *P. falciparum* та *E. coli*, що мають консервативний F, що відповідає Y125 у ДТД, проявляють набагато вищу гідролітичну активність щодо D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup>. Для ДТД *E. coli*  $k_{cat}/K_m$  становить  $6 \text{ мкМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$ , що у 18 разів вище за таку в термофільної ДТД. Каталітичні константи для інших ДТД відсутні, однак відомо, що 100 пМ ДТД *P. falciparum* гідролізує за 10 хв ту ж кількість субстрату, що й 100 нМ ДТД *T. thermophilus* [160].

**Результати досліджень, представлені у цьому підрозділі, опубліковані у таких роботах:**

1. 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.

2. **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. – *Biopolymers and Cell*, 2016, Vol. 32, № 5, P. 403.

3. **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. – *Acta biochimica polonica*, Vol. 63, Suppl., 1/2016. – P. 43.

4. **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. – *Biopolymers and Cell*, 2016, Vol. 32, № 4, P. 317.

5. **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” & 2<sup>nd</sup> Conference for young scientists of the division of Biochemistry, physiology and Molecular Biology NAS of Ukraine (CYS-2017), 6-9 June 2017, Kyiv. – *Ukr. Biochem. J.*, 2017, Vol. 89, №3, P. 108. DOI: 10.15407/ubj89.03.

6. **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. – *FEBS journal* 2017, 284, P. 293-294. DOI: 10.1111/febs.14174.

7. **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. – *Abstract book*, P. 61.

8. 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. – 27<sup>th</sup> tRNA Conference, 23-28 September 2018, Strasbourg, France. – *Abstract book*, P.190.

9. **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 Ukrainian biochemical congress, devoted 165-anniversary to I. Ya. Gorbachevskiy, 30 September-4 October 2019, Ternopil. – *Medical and Clinical Chemistry*, Vol. 21. – №3 (Supplement). – P. 43-44.

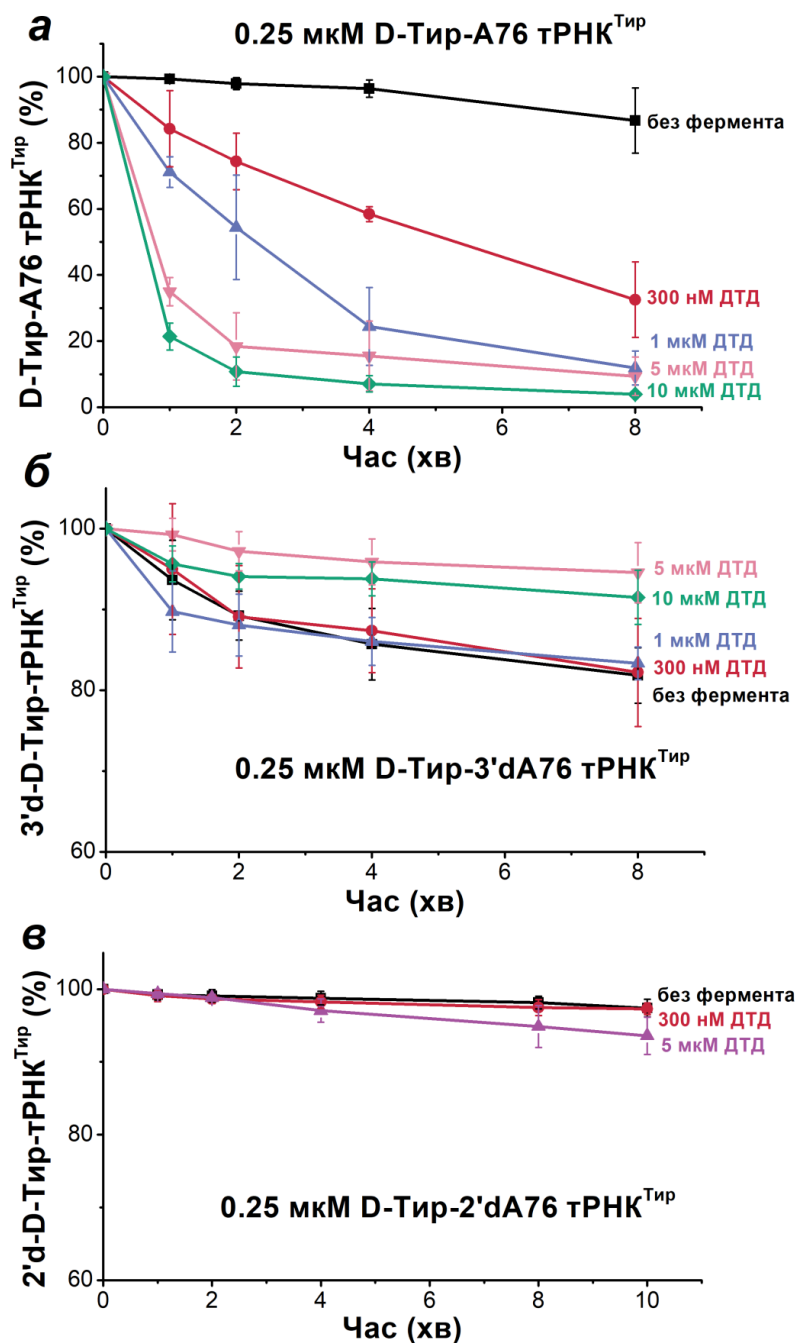
### **3.6. Роль тРНК<sup>Тир</sup> у процесі гідролізу помилково аміноацильованих D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> субстратів**

**3.6.1. Біохімічні властивості D/L-тирозил-2'd/3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup>.** Для дослідження участі гідроксильних груп тРНК<sup>Тир</sup> у процесі деацилювання за участі ДТД *T. thermophilus*, ми проводили біохімічні експерименти з різними помилково аміноацильованими D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> (2'dA76 або 3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup>) субстратами. Було підтверджено важливість наявності сусідніх гідроксильних груп тРНК<sup>Тир</sup> для гідролізу помилкових субстратів. Раніше дослідницькою групою Р. Санкаранараянан було показано, що ДТД *P. falciparum* (ДТДРФ) не могла деацилювати Глі-тРНК<sup>Глі</sup> в реакції з похідними A76 тРНК<sup>Глі</sup>, 2'-дезоксиаденозином та 2'-фтор-2'-дезоксиаденозином (навіть при 10 000-кратному надлишку фермента) [133]. А отже, було заявлено про істотну роль 2'-ОН у деацилюванні Глі-тРНК<sup>Глі</sup> за допомогою ДТД. Однак слід враховувати деякі обмеження у цій роботі: деацилювання Глі-3'dA76 тРНК<sup>Глі</sup> не було безпосередньо дослідженим, і, таким чином, висновок про роль 2'-ОН-залежного каталізу деацилювання в 3'-положенні не міг бути остаточно обґрунтованим. Крім того, гліцин є ахіральною амінокислотою, і субстрат для редагування – гліцин-3'-аміноаденозин (Глі3АА) – зв'язується з активним сайтом ДТДРФ, викликаючи помітні збурення хімічного зсуву спектру, порівняно з D-тирозил-3'-аміноаденозином (D-Тир3АА) [41]. Разом з тим механізм гідролізу двох субстратів може бути різним. Більше того, не було



біохімічних доказів, що підтверджували б роль обох гідроксильних груп тРНК під час деацилювання фрагментом D-аміноацил-тРНК.

У нашій роботі було отримано препаративні кількості субстратів D-Тир-2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> та D-Тир-3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup>, очищено та проведено реакцію деацилювання за участі ДТД *T. thermophilus*. Важливо, що на відміну від D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> (рис. 3.27. а), деацилювання помилково аміноацильованих варіантів D-Тир-2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> та D-Тир-3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> за низьких концентрацій (0.25 мкМ) не відбувалося навіть при значному надлишку фермента – 10 мкМ ДТД (рис. 3.27. б, в). Відсутність гідролізу D-Тир-2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> та D-Тир-3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> додатково підтверджує чистоту варіантів тРНК<sup>Тир</sup>, вільних від домішок A76 тРНК<sup>Тир</sup>. Дані вказують на нижчу спорідненість субстрату з D-тирозином, приєднаним до групи 2'-ОН (3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup>) порівняно з субстратом з D-тирозином, приєднаним до групи 3'-ОН (2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup>). Під час реакції спостерігали частковий неферментативний гідроліз помилково ацильованого субстрату D-Тир-3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup>. Варто зазначити, що нещодавно за допомогою ЯМР-експериментів 2D <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H TROSY на ДТДРФ було виявлено хімічний зсув за кількістю резонансів для D-тирозил-3'-аміноаденозину (D-Тир3АА, аналог D-тирозину, з'єданого з 3'-ОН аденозином), і відсутність таких зсувів для D-тирозил-2'-аміноаденозину (D-Тир2АА, аналог D-тирозину, з'єданого з 2'-ОН аденозином) [160]. Вцілому це підтверджує припущення про те, що деацилювання за участі ДТД відбувається з 3'-ОН групи тРНК<sup>Тир</sup>, але оскільки D-Тир приєднується лише до 2'-ОН групи тРНК<sup>Тир</sup> у реакції з ТирРС, спершу відбувається процес перенесення аміноацильного залишку з 2'→3'-ОН і лише тоді починається деацилювання. Міграція, що відбувається з первинного сайту (2'-ОН) до сусідньої ОН-групи (3'-ОН), є важливою для подальшого гідролізу, подібно до редагувальної активності ІлеРС, показаної раніше [165].

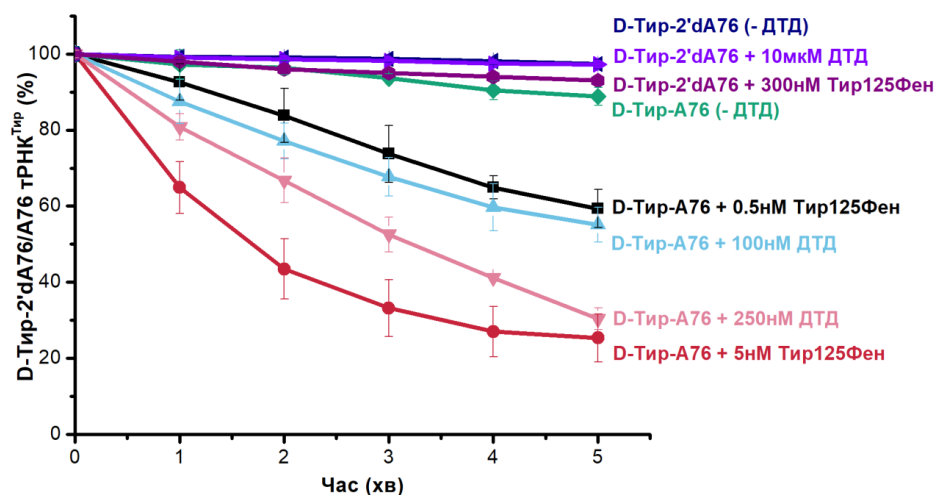


**Рис. 3.27.** Кінетика деацилювання D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup>, D-Тир-2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> та D-Тир-3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> у присутності ДТД: (а) 0.25 мкМ D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> і (б) 0.25 мкМ D-Тир-3'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> у буфері (чорні ■ квадрати), з 300 нМ ДТД (червоні ● кола), 1 мкМ ДТД (сині ▲ трикутники), 5 мкМ ДТД (рожеві ▼ трикутники), 10 мкМ ДТД (зелені ■ квадрати); (в) 0.25 мкМ D-Тир-2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> в буфері (зелені ■ квадрати), з 300 нМ ДТД (сині ■ квадрати), 5 мкМ ДТД (фіолетові ▲ трикутники). Дані представлені у вигляді середнього значення  $\pm$  SD від трьох незалежних експериментів

2'-гідроксильна група А76 тРНК<sup>Тир</sup> є проксимальною полярною групою до аміноацильного складноєфірного зв'язку. Можливе пояснення її участі в деацилюванні гліцину було представлено раніше С. Роутом та співавторами [133]. Ми з'ясували подвійну роль 2'-ОН групи А76-тРНК<sup>Тир</sup> у запобіганні помилкової трансляції D-Тир; спостерігали, що ДТД каталізує деацилювання специфічно з 3'-ОН групи, а вільна 2'-ОН група сприяє цьому гідролізу [157]. D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> швидко деацилюється, тоді як D-Тир-2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> (без інтактною 2'-ОН групи) практично не демонструють деацилювання. Після п'ятихвилинної інкубації 0.25 мкМ помилково зарядженої D-Тир-2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> з 10 мкМ ДТД або його мутантною формою Y125F він залишався майже на 100% аміноацильованим (рис. 3.28). На відміну від нього, за тих же умов, D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> була майже повністю деацильована. Згідно з нашими даними, приєднання D-Тир ТирРС відбувається специфічно до 2'-ОН групи А76 тРНК<sup>Тир</sup>, після чого для реакції гідролізу за участі ДТД цей субстрат переноситься на 3'-ОН групу (рис. 3.27); вільна 2'-ОН група А76 є критично важливою для деацилювання ДТД, про що свідчать наші біохімічні та квантово-хімічні дані, а також результати ЯМР-аналізу групи Р. Санкаранараяна [160].

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

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



**Рис. 3.28.** Кінетика деацилювання D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> та D-Тир-2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> за участі ДТД (WT) та ДТД (Y125F) при 37 °С. Концентрації субстратів D-Тир-A76/2'dA76 тРНК<sup>Тир</sup> складала 0.25 мкМ. Дані представлені як середнє значення з трьох незалежних повторів  $\pm$  SD

**Результати, представлені у цьому підрозділі, опубліковані у наступних роботах:**

1. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O. P., Tukalo M. A. (2018) The Dual Role of the 2'-OH Group of A76 tRNA<sup>Tyr</sup> in the Prevention of D-tyrosine Mistranslation. *Journal of molecular biology*, 430 (17), 2670-2676. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.06.036.
2. 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.
3. **Rybak M. Yu.** (2018 May) The role of 2'- and 3'-hydroxyl groups of A76 tRNA<sup>Tyr</sup> at the first steps of translation quality control. – Conference of Young Scientists “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology”, 23-25 May 2018, Kyiv. – *Ukr. Biochem. J.*, 2018. – Vol. 90. – № 3. – P.133.
4. **Rybak M. Yu.**, Tukalo M. A. (2018 September) Chirality during protein biosynthesis: the role of hydroxyl groups of tRNA<sup>Tyr</sup> 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. – *Ukr. Biochem. J.*, 2018. – Vol. 90 (Special Issue). – P. 145.

5. **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. – *Abstract book*. – P. 61.

6. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2018 September) The dual role of the 2'-OH group of A76 tRNA<sup>Tyr</sup> in the discrimination of D-Tyrosine during the first steps of translation. – 27<sup>th</sup> tRNA Conference, 23-28 September 2018, Strasbourg, France. – *Abstract book*. – P.186.

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

8. Tukalo 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. – 12<sup>th</sup> International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetases, 5-9 November 2019, Hangzhou, China. – *Abstract book*, P. 21.

### 3.7. Посттрансферне редагування помилково синтезованих D-аланіл-тРНК<sup>Ала</sup> за участі АлаРС

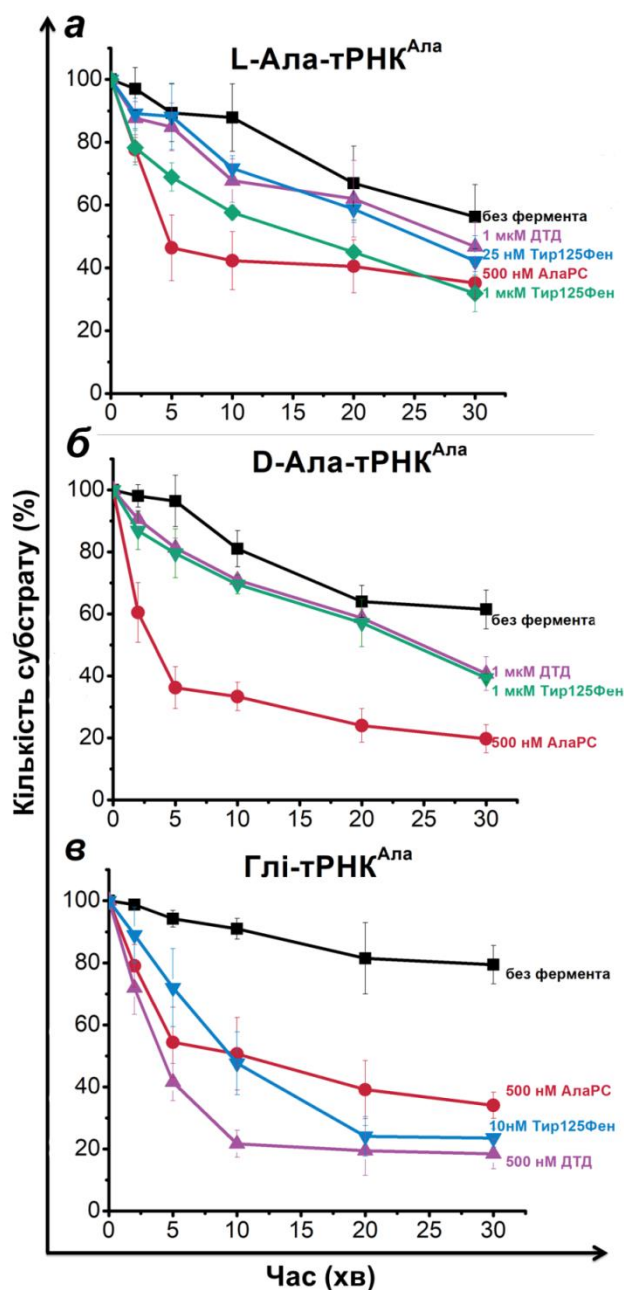
Для перевірки здатності АлаРС гідролізувати помилково активовані тРНК<sup>Ала</sup>, були проведені експерименти з деацилювання за участі [<sup>32</sup>P]-Глі/D-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> та 500 нМ АлаРС *T. thermophilus* в порівнянні з гідролізом L-Ала-тРНК<sup>Ала</sup>. Паралельно було перевірено також активність ДТД (WT) та її мутантної форми Y125F щодо гідролізу тРНК<sup>Ала</sup>, заряджених D-Ала. Порівняно

з ДТД (WT), мутантна форма Y125F проявляла 270-кратне збільшення каталітичної швидкості деацилювання субстратів D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> [163]. А отже, важливим було перевірити її активність щодо D-Ала та L-Ала-тРНК<sup>Ала</sup>.

На рис. 3.29 представлено кінетичні криві деацилювання всіх перевірених субстратів. Неочікувано, що АлаРС показала найвищу швидкість гідролізу стосовно D-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> (80% субстрату було гідролізовано за 30 хв) на відміну від дещо нижчої швидкості гідролізу L-Ала/Глі-тРНК<sup>Ала</sup> (60% субстрату – за 30 хв). Ми припускаємо, що таким чином редагувальний домен АлаРС *T. thermophilus* також відповідає за контроль стереоспецифічності амінокислот. Феномен редагування АлаРС споріднених субстратів L-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> був помічений дослідниками на АлаРС *E. coli* та може пояснюватись низькою специфічністю впізнавання корегувального домену синтетази, механізм якого залишається достеменно нез'ясованим.

На відміну від АлаРС, ДТД (як дикий тип, так і його більш активна мутантна форма Y125F) не виявляли гідролітичної активності щодо помилково ацильованих тРНК<sup>Ала</sup> з D-Ала. Однак фермент виявляв гідроліз для Глі-тРНК<sup>Ала</sup>. Факт гідролізу субстратів з Глі-тРНК<sup>Ала</sup> вперше був описаний для деацилаз *Plasmodium falciparum* та *E. coli* [133, 156]. Відповідно до кривих деацилювання L-Ала-тРНК<sup>Ала</sup>, ДТД (WT) *T. thermophilus* проявляла низький рівень гідролізу (приблизно 10% гідролізованих L-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> субстратів) навіть за високої концентрації фермента – 1 мкМ; в свою чергу його Y125F мутантна форма (1 мкМ) відображала удвічі вищий рівень гідролізу. Залежно від структури мотиву енантіоселективності (Глі-Про), розрізняють два різні класи деацилаз (ДТД): Глі-цис-Про (DTD) та Глі-транс-Про (ATD, специфічна для тваринних тРНК-деацилаза, або Animalia-specific tRNA-deacylase) [158]. Було показано, що деацилювання L-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> відбувається лише для класу ATD (деацилаз ссавців, людини, курки, *Danio rerio*) [158] на відміну від класу DTD (фермент *E. coli*) (51). Оскільки невідомим залишається той факт, у якій конфігурації знаходиться домен, що відповідає за стереоспецифічність, у ДТД *T. thermophilus* (цис- чи транс-), то ми не можемо стверджувати, до якого

структурного класу деацилаз належить термофільна ДТД. Однак дані щодо гідролізу L-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> свідчать на користь АТД-структури (Глі-*транс*-Про). Таким чином, наші результати узгоджуються з відомими літературними даними та свідчать про цікавий феномен відсутності редагувальної активності ДТД щодо D-Ала-тРНК<sup>Ала</sup>.



**Рис. 3.29.** Кінетика деацилювання L-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> (а), D-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> (б), Глі-тРНК<sup>Ала</sup> (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), n=3

**Результати досліджень, представлені у цьому підрозділі, опубліковані у таких роботах:**

1. **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.

2. **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. – *Abstract book*, P.7-8.

3. **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 Ukrainian biochemical congress, devoted 165-anniversary to I. Ya. Gorbachevskiy, 30 September-4 October 2019, Ternopil. – *Medical and Clinical Chemistry*, Vol. 21. – №3 (Supplement). – P. 43-44.

4. Tukalo 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. – 12<sup>th</sup> International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetases, 5-9 November 2019, Hangzhou, China. – *Abstract book*, P. 21.



## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

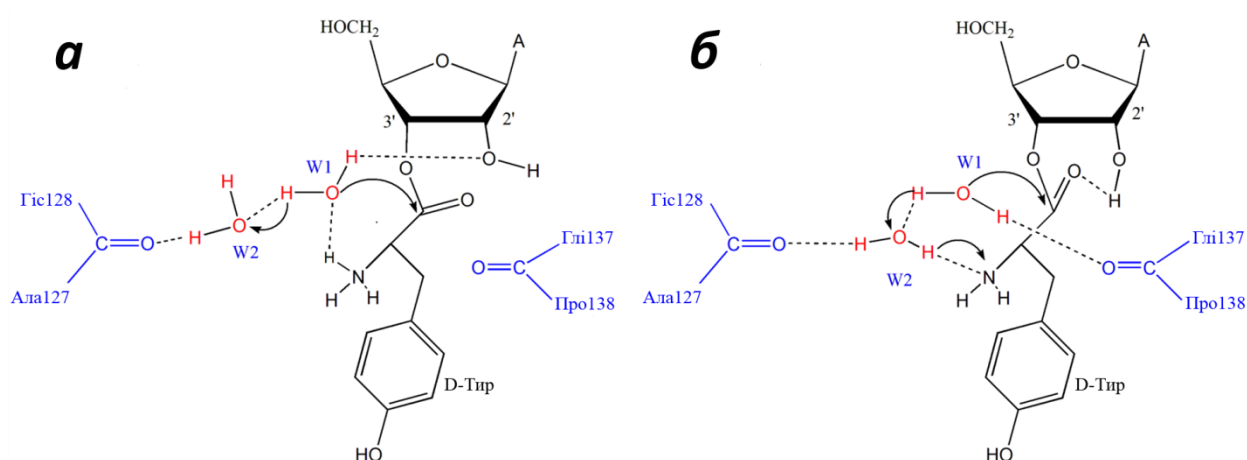
#### 4.1. Механізм гідролізу D-аміноацил-тРНК за участі *T. thermophilus* ДТД. Аналіз експериментальних даних та розрахунків на основі комп'ютерного квантово-механічного моделювання процесу деацилювання

Отримана модель залишку D-Тир-А76 в активному центрі ДТД в результаті симуляцій МД 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 механізму реакції гідролізу. Результати експериментальних та квантово-хімічних розрахунків представлені у спільній публікації з колегами [163].

Молекулярна система, що вивчалася, містила 19 амінокислот (Val76, Ser77, Gln78, Phe79, Thr80, Leu81, Gly123, Val124, Tyr125, Gly126, Ala127, His128, Met129, Arg130, Asp136, Gly137, Pro138, Val139, Thr140), але для спрощення в схемах зображено лише кілька амінокислотних залишків, які беруть безпосередню участь в процесі каталізу. Було показано, що у гідролізі беруть участь дві молекули води. Наявність атакуючої (W1) та асистуючої (W2) молекул води суттєво знижувала енергетичний бар'єр, необхідний для ефективного гідролізу помилкових D-аміноацил-тРНК.

Реакція деацилювання для субстрату D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> спершу була розрахована для такої, що містить протоновану аміногрупу тирозину. Схема показана на рис. 4.1. а. Однак в результаті обробки первинних даних стало зрозуміло, що за наявності протонованого залишку амінокислоти енергетичний бар'єр надто високий для того, щоб уможливити гідроліз помилково утвореного продукту. Енергія активації ( $\Delta E^\ddagger$ ) становила 46 ккал/моль (за наявності однієї молекули води в активному сайті) та 35.01 ккал/моль (за наявності двох

молекул води) відповідно. А отже, мінімальна енергія активації, обчислена для етапу, що лімітує швидкість реакції, досягала 35.01 ккал/моль. Це значення є очевидно занадто високим, щоб вважати його прийнятним для каталізу, і жодним чином не відповідає експериментальним даним, представленим у цій роботі. Тому ми припустили, що  $\alpha$ -аміногрупа тирозину субстрату, розташована в активному центрі, є непрототованою (рис. 4.1. б) за майже фізіологічних експериментальних умов, що використовувалися у нашому дослідженні (pH 7.5, T = 310 K).



**Рис. 4.1.** (а) Загальна схема гідролізу субстрату, що містить N<sup>+</sup>-протонований залишок Тир. (б) Загальна схема гідролізу субстрату, що містить залишок Тир з непротонованою групою NH<sub>2</sub>. На всіх рисунках 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 [163]

Такий підхід дозволив дослідити надійний механізм гідролізу із достатньо сильно зниженою енергією активації, що повністю відповідає експериментальним результатам. Ключова проблема тут полягає в правильній оцінці рівня основності аміногрупи субстрату, що знаходиться в активному центрі фермента. Значення рK<sub>a</sub> для  $\alpha$ -аміногруп вільних амінокислот, як

правило, трохи вище 9 (9.11 для тирозину) [183]. Таким чином, при рН 7.5 аміногрупа вільного тирозину здебільшого протонувана. Однак значення  $pK_a$  груп у білках та РНК, що підлягають іонізації, значно відрізняються від значень вільних мономерів завдяки мікрооточенню, створеному навколо групи, за 3D-структури біомакромолекули [184, 185]. Зсуви  $pK_a$  є результатом взаємодії групи з іншими повністю або частково зарядженими проксимальними групами, а також полярності та діелектричних властивостей середовища, що її оточує. Вплив мікрооточення на іонізуючі групи, виявлені на поверхні макромолекул, досить слабкий і викликає відносно невеликі збурення  $pK_a$  ( $< 2$  одиниць) [184]. Наприклад, з літературних даних відомі значення для N-кінцевих  $\alpha$ -аміногруп у білках, що знаходяться в межах  $7.7 \pm 0.5$  [186, 187]; проте вони значно нижчі, ніж у вільних амінокислот.

У нашій роботі для розрахунків DFT було використано структуру фермент-субстратного комплексу, отриманого після МД протягом 1370 пс, в якій протон був видалений з протонуваної аміногрупи тирозину. Була проведена повна геометрична оптимізація для вибраного комплексу активного центру D-аміноацил-тРНК-деацिलाзи з субстратом D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup>. Отримані результати дозволили запропонувати новий механізм каталітичного гідролізу аміноацилу (рис. 4.1. б та 4.2). Було показано, що гідроліз являє собою двоетапний процес, що включає утворення відносно нестійкого проміжного продукту реакції. Для реакції гідролізу було виявлено також два перехідні стани. У гідролізі беруть участь дві молекули води: одна (W1) – це реакційноздатний тип, який здійснює нуклеофільну атаку на ефір карбонілу, в результаті чого відбувається деацилювання рибози. Тоді як друга молекула води (W2) діє як допоміжний (асистуючий) тип, який координує W1, субстрат NH<sub>2</sub> та деякі амінокислотні залишки ферменту. Було виявлено, що кілька амінокислотних залишків сприяє гідролізу. Відповідні енергетичні параметри представлені в табл. 4.1.

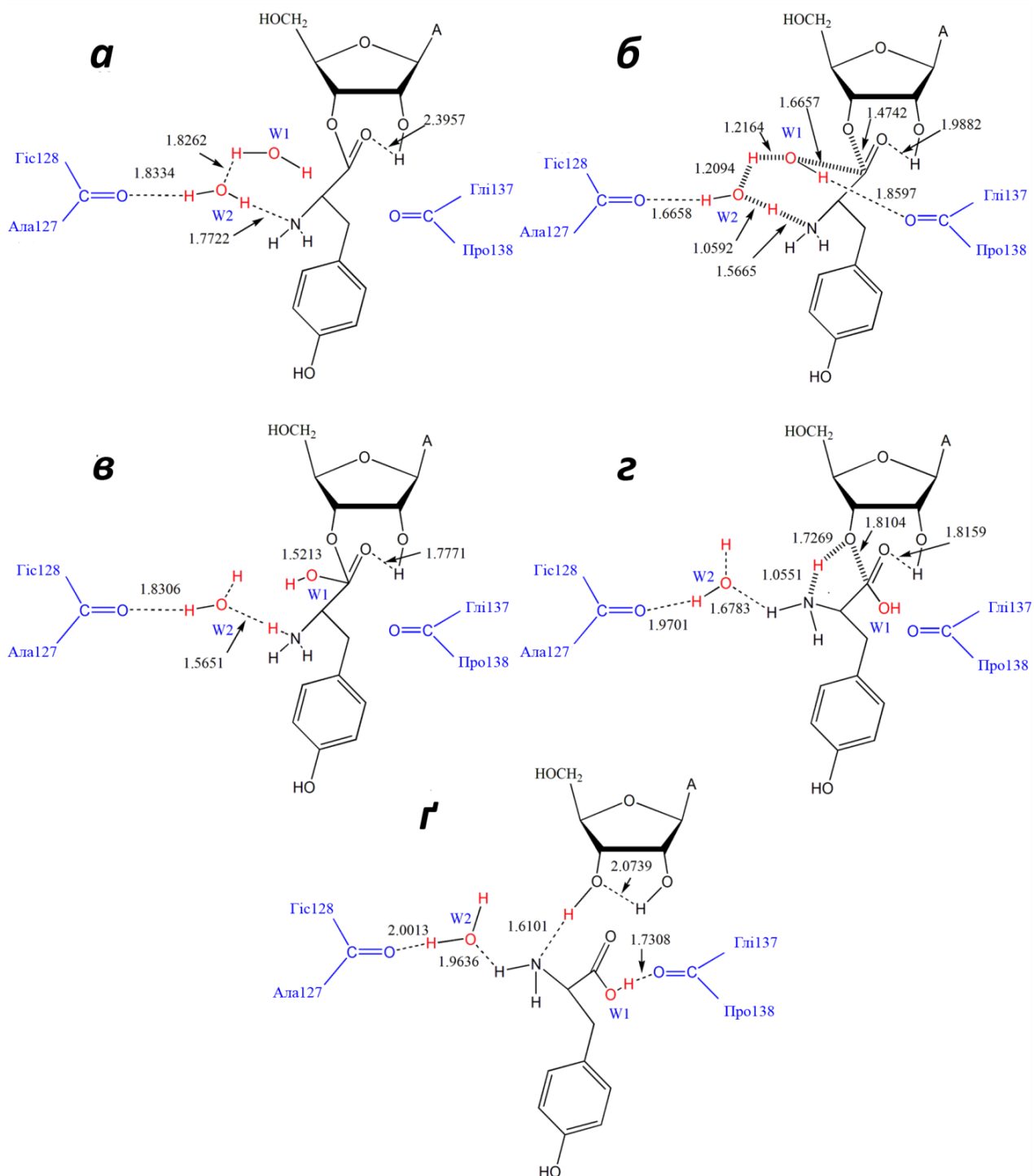
**DFT-розраховані енергетичні параметри передреакційних комплексів, перехідних станів, проміжних продуктів та продуктів реакції гідролізу\***

Структура	2'-замісник рибози	$\Delta E^\ddagger$ , ккал/моль	$\Delta G^\ddagger$ , ккал/моль
<b>TS1</b>	ОН	10.51	10.52
	Н	15.01	16.40
<b>TS2</b>	ОН	2.49	1.05
	Н	2.78	1.19

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

Розрахована структура передреакційного комплексу представлена на рис. 4.2. *a*. Особливий інтерес представляє просторове розташування пари молекул води, що беруть участь у процесі. Ми не розглядали системи, що містила б одну молекулу води в активному сайті, оскільки раніше наша група продемонструвала [148], що для ‘гладкого’ ефективного гідролізу аміноацилів потрібні принаймні дві молекули води. Добре організована участь двох молекул води, атакуючої та асистуючої, призвела до значного зниження енергії активації на етапі, який обмежує швидкість, що також відповідає висновкам інших авторів [188, 189].

У передреакційному комплексі між ефірним карбонілом субстрату та 2'-ОН групою рибози утворюється водневий зв'язок. Молекула води W1 зв'язана Н-зв'язком з допоміжною молекулою води W2, яка потім координується системою водневих зв'язків, при цьому аміногрупа тирозину та карбонільного кисню амідного зв'язку знаходиться між залишками ферменту Ala127 та His128.



**Рис. 4.2.** Механізм гідролізу D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> за участі ДТД [163]. (а) Структура передреакційного комплексу. Числа позначають довжину зв'язку в ангстремах (Å). (б) Перехідний стан 1 (TS1). Штрихові лінії представляють зв'язки в TS. (в) Проміжний продукт реакції. (г) Перехідний стан 2 (TS2). (д) Продукти реакції гідролізу

Під час першого перехідного стану, TS1 (рис. 4.2. б), протон атакуючої молекули води, W1, починає рухатися до асистуючої молекули води W2, яка потім передає один із своїх протонів до неподіленої пари електронів аміногрупи тирозину. 2'-ОН група рибози субстрату відіграє важливу роль у просторовій перебудові атомів у точці перехідного стану. Водневий зв'язок між 2'-ОН групою та карбонільним О атомом субстрату в TS1 є міцнішим, ніж у передреакційному комплексі. Цей факт підтверджується скороченням зв'язків з 2.3957 до 1.9882 Å та збільшенням порядку МО (молекулярно орбітального) зв'язку з 0.0176 до 0.2820.

Після проходження точки TS1 утворюється проміжний продукт реакції (рис. 4.2. в). За допомогою цього проміжного продукту гідроксил W1 утворює хімічний зв'язок з атомом вуглецю карбонільної групи тирозину, тоді як протон W2 в цей момент повністю переноситься на атом азоту  $\alpha$ -аміногрупи. Валентний зв'язок між атомом вуглецю карбонілу Тир та 3'-О атомом рибози значно послаблюється і може легко розірватися. Довжина цього зв'язку збільшується з 1.4359 до 1.5213Å, а порядок МО зв'язків зменшується з 0.6848 до 0.0398. Крім того, спостерігається подальше посилення Н-зв'язку між групою 2'-ОН та карбонільним киснем залишку Тир. Його довжина в проміжному продукті становить 1.77778Å, а значення порядку МО зв'язків збільшується до 0.3991. Обчислена енергія активації для проміжного продукту у TS1 є досить низькою ( $\Delta G^\ddagger$  становить лише 10.52 ккал/моль).

Зміни, що спостерігалися в структурі досліджуваної системи заклали основи для розуміння природи та побудови вихідної точки пошуку перехідного стану для другого етапу реакції: перетворення проміжного продукту в продукти гідролізу. Локалізована точка TS2 показана на рис. 4.2. г, а відповідні енергетичні параметри представлені в табл. 4.1. Енергія активації другого етапу гідролізу є дуже низькою ( $\Delta G^\ddagger = 1.05$  ккал/моль), значно нижчою, ніж енергія на першому етапі. Отже, проміжний продукт реакції є лабільним і може трансформуватися в продукти реакції майже спонтанно. Таким чином, перший

етап гідролізу, тобто етап формування проміжного продукту, є таким, що обмежує або лімітує швидкість реакції гідролізу.

З TS2 реакція легко протікає до відщеплення залишку Тир від рибози з утворенням продуктів деацилювання. Вони зв'язані в активному сайті, утворюючи міжмолекулярний комплекс (рис. 4.2. *t*). У цьому комплексі водневий зв'язок між 2'-ОН групою рибози та карбоксильним киснем субстрату відсутній. Натомість утворюється Н-зв'язок між 3'-ОН групою рибози та NH<sub>2</sub> групою тирозину. Крім того, цей комплекс продуктів реакції стабілізується водневими зв'язками між COOH групою та атомом кисню карбонільної групи амідного зв'язку в фрагменті Gly137-Pro138. Асистуюча молекула води, W2, орієнтована на формування двох Н-зв'язків, з тирозиною α-NH<sub>2</sub> групою та карбонільною групою, що належить до фрагменту Ala127-His128 фермента.

Слід наголосити, що амінокислотні залишки Gly137 та Pro138 відіграють основну роль у процесі гідролізу. Вони допомагають правильній орієнтації W1, що є особливо очевидним в точці TS1. Важливо, що мотив Gly137-Pro138, консервативний серед ДТД, є вирішальним для забезпечення енантіоселективності фермента [156]. Результати сайт-спрямованого мутагенезу залишків Gly137 та Pro138 (деацилювання мутантними формами ДТД G137A, P138A та P138H) свідчать на користь їхньої ролі у гідролізі помилкових субстратів. У той же час, залишки His128 та Ala127 впливають як на положення, так і на активність W2 на всіх стадіях реакції. Щоправда, амінокислотні заміни A127M та A127V практично не впливають на активність ДТД (рис. 3.25 та рис. 3.26).

Енергетичні параметри описаного механізму реакції були також розраховані для аналога субстрату, де 2'-ОН кінцевої рибози був заміщений атомом гідрогену (аденозин → 2'-дезоксааденозин). У цьому випадку координація тирозинового карбонілу 2'-ОН групою на всіх етапах процесу очевидно є неможливою. Енергія активації,  $\Delta G^\ddagger$ , лімітуючої стадії реакції зросла тут від 10.52 до 16.40 ккал/моль, тобто на 5.88 ккал/моль (табл. 4.1) і добре відповідає експериментальним даним (~5 ккал/моль) (рис. 3.28).

Всі ці дані узгоджуються з твердженням щодо ключової ролі 2'-гідроксильної групи у гідролітичних перетвореннях аміноацил-тРНК, що були досліджені нами біохімічно. У цьому випадку другий етап процесу, а саме – проміжне розщеплення, також не є обмежувальним етапом швидкості, оскільки енергія його активації становить лише 1.19 ккал/моль.

Отже, було досліджено механізм гідролізу помилково ацильованих D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> за участі D-аміноацил-тРНК-деацилази *T. thermophilus* з використанням методів молекулярного моделювання, симуляцій МД, квантово-хімічних розрахунків (QM), сайт-спрямованого 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. 2'-ОН група кінцевого A76 D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> утворює внутрішньомолекулярний водневий зв'язок з карбонільною групою D-тирозины. Його утворення є важливим для перебудови атомів у перехідному стані та формування проміжного продукту реакції.

Цей механізм значно відрізняється від запропонованих раніше тРНК-асистованих пост-трансферних механізмів редагування, що вказували на роль 2'- та 3'-ОН груп A76 тРНК в активації нуклеофільної молекули води для ініціювання гідролізу в ФенРС [145, 146], ПроРС [147], ЛейРС [149, 150], архейній ТреРС [151], та ДТД *P. falciparum* [160]. Механізми редагування у цих системах ґрунтувалися на розрахунках із використанням підходу QM/MM, недоліком якого була дуже обмежена частина QM (зазвичай 70-90 атомів). На відміну від цього, ми використовували повний метод QM з більш всеохоплюючою моделлю редагування для ПроРС, який містив 480 атомів [148]. Нами було визначено перехідний стан реакції та показано альтернативний механізм гідролізу. У цьому каталітичному механізмі 2'-ОН група аденозину 76 утворює внутрішньомолекулярний водневий зв'язок з карбонільною групою аланінового залишку, сильно полегшуючи гідроліз. Ми також показали значення утворення такого водневого зв'язку для гідролізу



помилково ацильованих D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> за участі ДТД, використовуючи систему для обчислень QM, що містила 276 атомів.

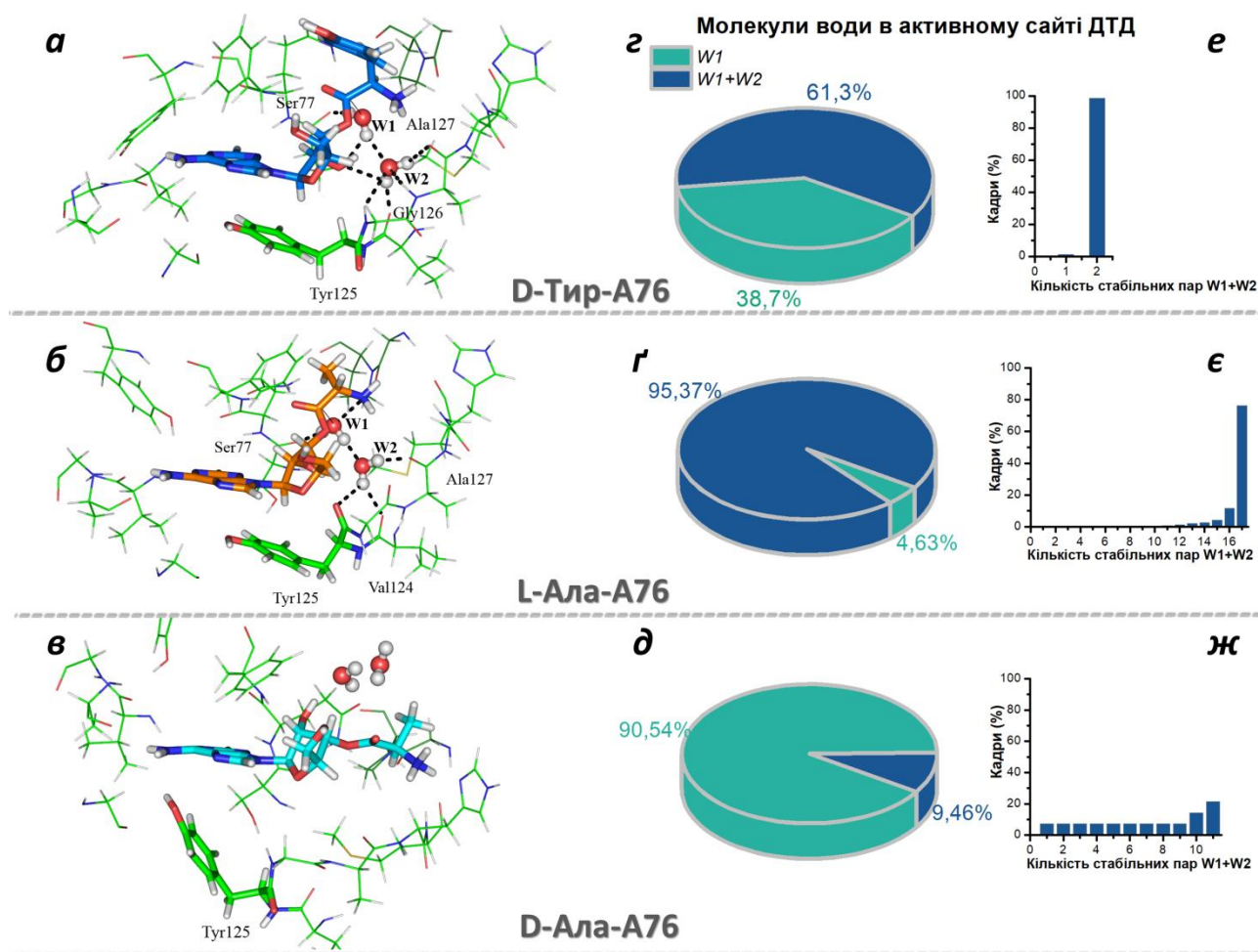
Важливо, що у цьому механізмі аміногрупа D-Тир є непротонованою. Ця група підвищує реактивність проксимальних молекул води на основі утворення більшої кількості нуклеофільних видів через загальну основу механізму каталізу. Дві молекули води необхідні для 'гладкого' гідролізу аміноацилу. У той же час мутагенез та комп'ютерні розрахунки не давали жодних доказів щодо участі бічних ланцюгів амінокислот білка безпосередньо в каталізі. На шляху гідролізу важливим є лише основний ланцюг певних амінокислот (а саме їх карбонільних груп, що належать до фрагментів ферменту Gly137-Pro138 та Ala127-His128). Це дає пояснення для механізму роботи ДТД, що діє як гідролаза для багатьох D-аміноацил-тРНК. Роль залишку Tyr125/Phe125 також важлива для модулювання активності фермента через контакт із C1 положенням рибози в A76 через СН/π взаємодії. Це, ймовірно, відповідає за утворення високореактивної конформації D-Тир-A76 в активному центрі фермента. Біохімічні дані щодо мутантної форми Y125F ДТД *T. thermophilus* свідчать на користь цього твердження: такий фермент має каталітичну активність у 270 разів вищу за ДТД дикого типу (табл. 3.6). Таким чином, результати цієї роботи можуть заохотити майбутні поглиблені дослідження механізмів редагування помилково утворених аміноацил-тРНК іншими ферментами.

#### **4.2. Порівняння даних комп'ютерних розрахунків з даними гідролізу D-Тир/D-Ала/-L-Ала-тРНК за участі ДТД *T. thermophilus***

Для отримання більш глибокого розуміння процесу деацилювання помилково заряджених тРНК<sup>Ала</sup> з D-Ала, було проведено симуляції МД цих субстратів. Поведінка субстратів (з L-Ала та D-Ала) та середовища аналізували за допомогою розробленого скрипту у Python, який визначав усі можливі атакуючі (W1) та асистуючі (W2) молекули води в активному сайті ДТД протягом 5 нс моделювання МД. Загалом, субстрат-асистований каталітичний

механізм гідролізу L-Ала-тРНК<sup>Ала</sup>, в якому бере участь дві молекули води, має багато спільного з тим, що був запропонований нами для гідролізу D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> [163]. На рис. 4.3 показані передумови для нуклеофільної атаки D-Тир-А76 (а), L-Ала-А76 (б) та D-Ала-А76 (в). Молекули води, які відповідали умовам відстані ( $< 3.5 \text{ \AA}$ ) та кута Бургі-Дуніца (Burgi–Dunitz) ( $105\text{--}107^\circ$ ), були визначені як W1. Якщо алгоритм знаходив асистуючу молекулу води на відповідній відстані ( $< 3,5 \text{ \AA}$ ) та потенційні залишки амінокислот, які могли б її активувати, молекула води була помічена як W2 у списку даних. Загалом було виявлено, що 124 кадрів демонстрували наявність W1 в умовах кута Бургі-Дуніца для гідролізу цього субстрату, і 76 з них (61.3%) також показали допоміжні молекули W2 (рис. 4.3. з). Протягом симуляцій МД спостерігалось лише дві стабільні пари (W1+W2). Одна з цих пар була ефективно закріплена і з'являлася в 98.7% кадрів (рис. 4.3. і). На противагу D-Тир-А76 субстрату, для D-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> ми отримали 148 кадрів, лише 14 з яких також відображали W2 (9.5% кадрів) (рис. 4.3. е). Однак, серед 14 пар W1+W2 лише одна була представлена на 21% кадрів в МД (рис. 4.3. ж). Ми припускаємо, що таке слабе водне оточення унеможливило успішну нуклеофільну атаку субстрату D-Ала-А76 і тому не призводило до його гідролізу ДТД (рис. 3.29. б).

Стосовно L-Ала-А76 субстратів, то на 782 кадрах МД із 820 (95.37%) була присутня друга молекула води (W2) для гідролізу L-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> за участі ДТД (рис. 4.3. д). Цікаво, що серед 17 стабільних пар води була одна, яка була присутня у 76% кадрів (рис. 4.3. е). Цей факт може пояснити низьку швидкість гідролізу зарядженої тРНК<sup>Ала</sup> за допомогою L-Ала, що спостерігалась при біохімічних тестуваннях із [<sup>32</sup>P]-міченими субстратами (рис. 3.29. а).

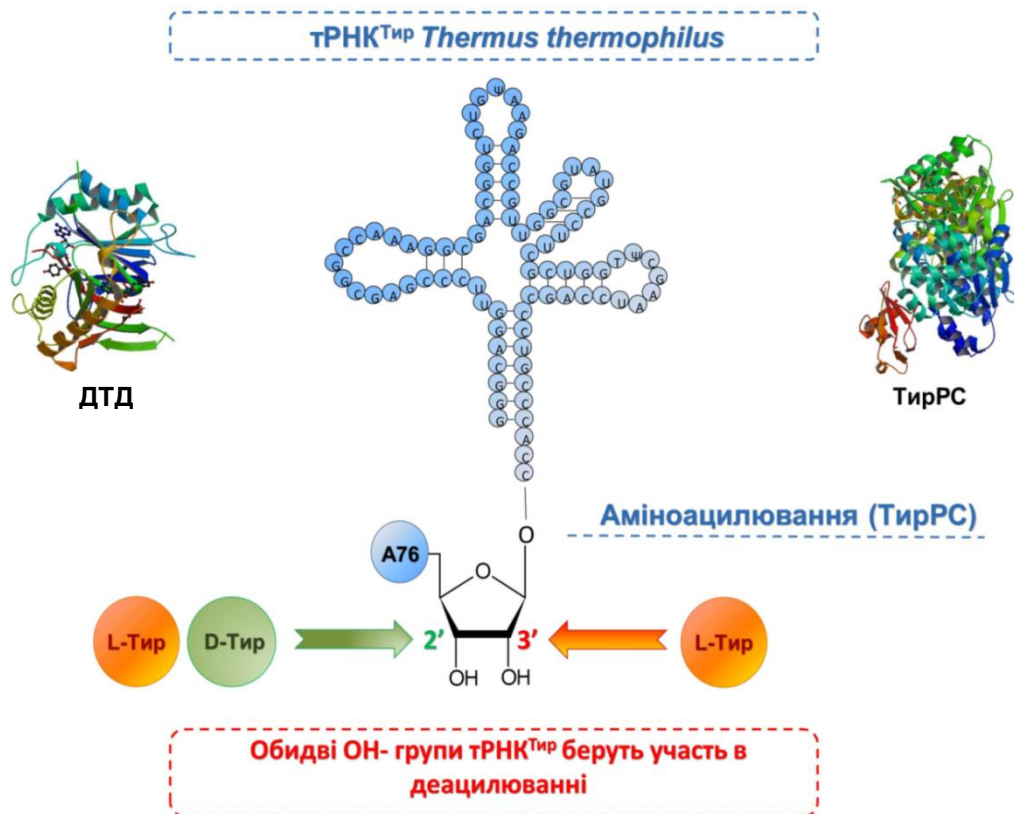


**Рис. 4.3.** Просторові передумови нуклеофільної атаки на різні субстрати в сайті зв'язування ДТД *T. thermophilus* [179]. Всі комплекси представлені однаковою картиною зупиненої динаміки (1370 пс), як було раніше описано для D-Тир-А76 (а) у статті [163]. Цей кадр відображає загальну тенденцію для кожної симуляції МД, а саме для D-Тир-А76 (а) та L-Ала-А76 (б). На доповнення до очевидної різниці в напрямку атаки, D-Ала-А76 (в) втрачає свої стекінгові контакти з Тир125 і формує слабку мережу Н-зв'язків. (з, і, д) Наявність атакуючих (W1) та асистуючих (W2) молекул води в активному сайті ДТД протягом 5 нс симуляцій МД. (е, є, ж) Кількість та коефіцієнти стабільної пари W1 з W2 в заданих часових рамках для D-Тир-А76 (е), L-Ала-А76 (є), D-Ала-А76 (ж)

А отже, аналіз даних водного оточення протягом 5 нс МД та результати біохімічних тестувань вказали на потенційну причину відсутності гідролізу D-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> за участі ДТД на відміну від субстратів з D-Тир-А76 та L-Ала-А76.

### 4.3. Узагальнення даних, отриманих для ТирРС, АлаРС та ДТД *T. thermophilus*

У результаті проведених досліджень було з'ясовано первинні сайти приєднання енантиомерів Тир до *T. thermophilus* тРНК<sup>Тир</sup>, а також встановлено важливість обох гідроксильних груп А76 тРНК<sup>Тир</sup> для гідролізу помилково сформованих субстратів D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> (рис. 4.4). За допомогою методів комп'ютерного моделювання, молекулярної динаміки, квантової хімії та біохімічних тестувань було встановлено механізм гідролізу D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup> за участі ДТД, важливою ознакою якого є наявність двох молекул води в активному центрі фермента та непротонований залишок аміногрупи D-Тир субстрату.



**Рис. 4.4.** Роль ОН-груп А76 тРНК<sup>Тир</sup> 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 [157]

Було також порівняно потенціал контролю стереоспецифічності в біосинтезі білка еволюційно ранніми (АлаРС) та пізніми (ТирРС) представниками родини АРСаз (табл. 3.1, 3.4, 3.5, рис. 3.10). Як теоретичні, так і експериментальні дослідження АРСаз підтверджують гіпотезу коеволюції генетичного коду, амінокислот та АРСаз. Відповідно, найбільш ранньою (або вихідною) точкою був код для Ала з подальшим додаванням Глі та інших амінокислот; Тир з'явився серед групи амінокислот, які відносно нещодавно були додані до генетичного коду [190]. Найбільш ранні вісім амінокислот (аланін, аспартат, глутамат, гліцин, ізолейцин, лейцин, пролін та валін) [191], синтезовані методом електричного розряду Міллера [192, 193], були також виявлені в метеориті Мерчисона (Murchison meteorite) [194]. Як L-, так і D-енантіомери цих восьми амінокислот були ймовірно залучені до найбільш раннього синтезу примітивних білків, побудованих з амінокислот у середовищі до еволюції біосинтетичних шляхів. Складаючи предкову нуклеозидкіназу, Шібуе з колегами систематично зменшували розмір амінокислотного складу цього ферменту і запропонували роль найбільш ранніх амінокислот (включаючи Ала) у створенні стійких білкових структур та інших амінокислот з функціональним бічним ланцюгом (як Тир) для досягнення ефективного каталізу [195]. Стародавня поява Ала сприяла апарату трансляції у вирішення парадоксу потенційної помилкової активації D-енантіомерів [195]. Конвергенція ранніх та пізніх амінокислот під час еволюції зумовила появу різних стратегій контролю якості під час біосинтезу білка. Наприклад, АлаРС має редагувальний домен, а ТирРС не має його завдяки еволюційному процесу. Цілком ймовірно, що появі ферментів ДТД сприяв брак стереоспецифічності ТирРС.

Примітно, що АлаРС має труднощі у розрізненні найменших амінокислот – гліцину, аланіну та серину. Отже, АлаРС може ефективно аміноацилювати тРНК<sup>Ала</sup> цими малими амінокислотами [53] та редагувати помилково утворені продукти [38]. Однак відомо, що пневмококова АлаРС також помилково активує тРНК<sup>Фен</sup> [196].

Нами було виявлено нові явища активації та редагування D-амінокислот. Було з'ясовано, що *T. thermophilus* АлаРС помилково аміноацилює тРНК<sup>Ала</sup> неспорідненими D-Ала та D-Сер (рис. 3.11 та рис. 3.26). Раніше дослідниками було показано дуже низьку швидкість аміноацилювання лише для D-Ала-мініхелікса РНК (рис. S2 в [63]). Автори припускали, що гомохіральність у білках визнається на етапі аміноацилювання, а також, що гомохіральність РНК визнає селективність енантіомерів. Ми припускаємо, що в апараті трансляції можуть існувати різні сценарії регулювання стереоспецифічного контролю амінокислот залежно від наявності чи відсутності функції редагування у АРСаз.

Для виправлення помилок включення неспоріднених амінокислот, у процесі еволюції з'явилися дві окремі групи факторів редагування. *Цис*-редагувальна функція підтримується редагувальним доменом АлаРС, який головним чином відповідає за деацилювання Глі та Сер-тРНК<sup>Ала</sup> [38]. AlaX-S є *транс*-редагувальним фактором, який виявляє недостатню специфічність до тРНК та гідролізує Сер-тРНК<sup>Ала</sup>/тРНК<sup>Тре</sup>/тРНК<sup>Про</sup> [177]. Відомо також, що АТД демонструє послаблення специфічності до субстрату, деацилюючи L-Ала-тРНК<sup>Ала</sup>/тРНК<sup>Тре</sup> [158] та DTD сама по собі, демонструючи позитивний відбір універсальної інваріантної тРНК<sup>Ала</sup>-специфічної пари G3:U70. АТД є основним клітинним фактором деацилювання гліцину, що гідролізує помилково активновані Глі-тРНК<sup>Ала</sup> як у про-, так і в еукаріотів [156]. Крім того, існують дві родини тРНК-залежних трансфераз, MurMN та FemABX, щоб використовувать L-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> в якості субстратів для перенесення L-Ала на пептидоглікановий перехресний міст. MurM залучений у приєднання перших амінокислот (Ала або Сер) до цього мосту, MurN – другої амінокислоти (Ала) [197] до ліпідної проміжної сполуки II в біосинтезі пептидогліканів [198].

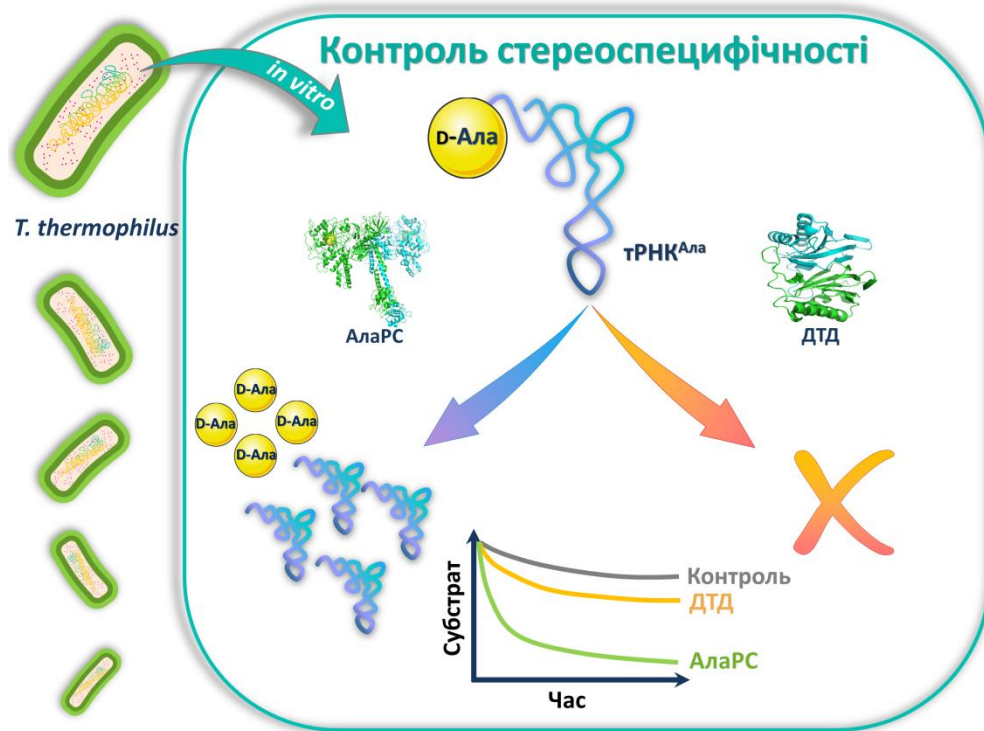
Нещодавно було показано, що трансредагувальна активність MurM не вимагає наявності його другого ліпідного субстрату [196], і цей білок здатний деацилювати не лише L-Ала/L-Сер-тРНК<sup>Ала</sup>, але й L-Ала-тРНК<sup>Сер</sup>/тРНК<sup>Фен</sup>/тРНК<sup>Ліз</sup> та Сер-тРНК<sup>Фен</sup> [199]. Таким чином, MurM є посередником між системою модифікації клітинної стінки, контролем якості

трансляції та жорсткою реакцією клітини на зовнішні стресові навантаження [199]. Родина нерибосомальних пептидилтрансфераз FemABX [200] має унікальний каталітичний механізм [201]. Специфічність FemXs головним чином залежить від послідовності тРНК, хоча наявність пари G3:U70, головної детермінанти впізнавання АлаРС, не є важливою для розпізнавання FemX [202]. Ці аміноацилтрансферази розрізняють Ала-тРНК<sup>Ала</sup> та Сер-тРНК<sup>Сер</sup>. Експерименти з D-Ала/L-Ала-спіралями<sup>Ала</sup> показали каталітичну перевагу субстратів з L-Ала [203].

Отже, ціла низка *транс*-редагувальних факторів залучена до контролю рівнів вільних L- та D-амінокислот.

Наше дослідження продемонструвало, що як АлаРС *T. thermophilus*, так і ДТД володіють гідролітичною активністю відносно спорідненого для АлаРС субстрату L-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> та неспорідненого – Глі-тРНК<sup>Ала</sup> (рис. 3.29). Важливо зазначити, що механізми деацилювання тРНК<sup>Ала</sup>, активованих D-Ала, раніше не були описані. Це дослідження виявило досі невідому функцію редагувального домену АлаРС в хіральному контролі під час трансляції (рис. 4.5). Дані вказують на те, що АлаРС ефективно гідролізує помилково ацильовані субстрати D-Ала-тРНК<sup>Ала</sup> (рис. 3.29).

Ми припускаємо, що разом з AlaX-S і ДТД, MurM та FemX [200] були вихідними/давніми *транс*-редагувальними факторами, що контролювали рівні тРНК<sup>Ала</sup>, активованих спорідненими та неспорідненими амінокислотами, таким чином забезпечуючи належні клітинні концентрації вільних Сер, Глі та Ала. Всі ці структурно відмінні ферменти демонструють, що атоми головного ланцюга амінокислотних залишків необхідні для їхньої каталітичної функції та демонструють послаблену (релаксовану) специфічність до субстрату.



**Рис. 4.5.** Схема стереоспецифічного контролю за участі ДТД та АлаРС. Адаптовано з [179]

Швидше за все, в процесі еволюції відбувалася поступова фіксація гомохіральності амінокислот в біосинтезі білка. З наших даних можна постулювати два основні сценарії такої фіксації. За першим сценарієм, ДТД з'явилася, щоб допомагати такій фіксації на ранніх етапах еволюції. За другим сценарієм, що видається більш ймовірним, кілька ДТД ферментів з'явилися пізніше і «співпрацювали» з АРСазами для встановлення хіральної селективності амінокислот апаратом трансляції. Згідно з першим сценарієм, всі ДТД повинні були виникнути від спільного попередника. Однак існує кілька типів ДТД (DTD1, DTD2, DTD3 та ATD), більшість з яких структурно відрізняються [127, 129, 158]. А відтак цей факт слугує на користь другого сценарію.

Незалежно від походження першої амінокислоти (високий електричний заряд, вулканічне або метеоритне походження), природа стикалася з високою концентрацією малих амінокислот – гліцину та аланіну – та їх D-енантіомерів



(L/D-Ала) під час хімічної еволюції та на ранніх стадіях біологічної еволюції [67]. Отже, перший предок АлаРС брав участь у деацилюванні помилково ацильованих тРНК<sup>Ала</sup> як Глі, так і D-Ала (також з Сер), оскільки включення саме цих помилкових амінокислот різко змінювало структуру синтезованого пептиду чи білка. Отже, цілком ймовірно, що попередник АлаРС (або AlaX, а потім і сама АлаРС) міг набути редагувальної активності проти обох субстратів: як з Глі, так і з D-Ала.

Таким чином, можна припустити, що потенційно існують дві різні стратегії встановлення хіральної селективності апарату трансляції: за участі та без участі ДТД, що надалі демонструють «давній» та «ранній» механізми контролю точності. У цьому твердженні наші результати підтримують ранній (Ала) та пізній (Тир) сценарії еволюції АРСаз, підтверджуючи розвиток різних систем в якості редагувальних факторів.

## ВИСНОВКИ

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

1. Розроблено двостадійну методику очистки АлаРС(6xГіс), що включає афінну та гель-фільтраційну хроматографію 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<sup>Ала</sup>.

4. Уперше встановлено сайти приєднання L- та D-Тир до тРНК<sup>Тир</sup> 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<sup>Тир</sup>, що полягає в активації D-Тир ТирРС та в асистуванні ДТД-опосередкованого гідролізу D-Тир-тРНК<sup>Тир</sup>.

7. Уперше встановлено, що редагувальний домен АлаРС відповідає за контроль стереоспецифічності, гідролізуючи D-Ала-тРНК<sup>Ала</sup>.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ibba, M. and D. Söll, *Aminoacyl-tRNA synthesis*. Annual review of biochemistry, 2000. 69(1): p. 617-650.
2. Calendar, R. and P. Berg, *The catalytic properties of tyrosyl ribonucleic acid synthetases from Escherichia coli and Bacillus subtilis*. Biochemistry, 1966. 5(5): p. 1690-1695.
3. Calendar, R. and P. Berg, *D-Tyrosyl RNA: formation, hydrolysis and utilization for protein synthesis*. Journal of molecular biology, 1967. 26(1): p. 39-54.
4. Bhatt, T.K., R. Soni, and D. Sharma, *Recent Updates on DTD (D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup> Deacylase): An Enzyme Essential for Fidelity and Quality of Protein Synthesis*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2016. 4: p. 32.
5. Calendar, R., *d-Tyrosyl-tRNA Deacylase: A New Function*. Trends in biochemical sciences, 2017. 42(9): p. 684-686.
6. Ling, J., N. Reynolds, and M. Ibba, *Aminoacyl-tRNA Synthesis and Translational Quality Control*. Annual Review of Microbiology, 2009. 63(1): p. 61-78.
7. Sankaranarayanan, R. and D. Moras, *The fidelity of the translation of the genetic code*. Acta Biochimica Polonica, 2001. 48(2): p. 323-335.
8. Yadavalli, S.S. and M. Ibba, *Quality control in aminoacyl-tRNA synthesis its role in translational fidelity*. Adv Protein Chem Struct Biol, 2012. 86: p. 1-43.
9. Bergmann, F.H., P. Berg, and M. Dieckmann, *The Enzymic Synthesis of Amino Acyl Derivatives of Ribonucleic Acid II. The preparation of leucyl-, valyl-, isoleucyl-, and methionyl ribonucleic acid synthetases from Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 1961. 236(6): p. 1735-1740.
10. Norton, S., et al., *Purification and properties of the aspartyl ribonucleic acid synthetase of Lactobacillus arabinosus*. Journal of Biological Chemistry, 1963. 238(1): p. 269-274.
11. Crick, F., *On degenerate templates and the adaptor hypothesis*. Unpublished, 1955.

12. Hoagland, M.B., P.C. Zamecnik, and M.L. Stephenson, *Intermediate reactions in protein biosynthesis*. *Biochimica et biophysica acta*, 1957. 24(1): p. 215.
13. Hoagland, M.B., E.B. Keller, and P.C. Zamecnik, *Enzymatic carboxyl activation of amino acids*. *J Biol Chem*, 1956. 218(1): p. 345-358.
14. Hoagland, M.B., *An enzymic mechanism for amino acid activation in animal tissues*. *Biochimica et biophysica acta*, 1955. 16(2): p. 288-289.
15. Fersht, A.R. and M.M. Kaethner, *Mechanism of aminoacylation of tRNA. Proof of the aminoacyl adenylate pathway for the isoleucyl-and tyrosyl-tRNA synthetases from Escherichia coli K12*. *Biochemistry*, 1976. 15(4): p. 818-823.
16. Peacock, J.R., et al., *Amino acid-dependent stability of the acyl linkage in aminoacyl-tRNA*. *Rna*, 2014. 20(6): p. 758-764.
17. Schimmel, P., *Classes of aminoacyl-tRNA synthetases and the establishment of the genetic code*. *Trends in biochemical sciences*, 1991. 16: p. 1-3.
18. Eriani, G., et al., *Partition of tRNA Synthetases into Two Classes Based on Mutually Exclusive Sets of Sequence Motifs*. *Nature*, 1990. 347(6289): p. 203.
19. Schimmel, P.R. and D. Söll, *Aminoacyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs*. *Annual review of biochemistry*, 1979. 48(1): p. 601-648.
20. Sprinzl, M. and F. Cramer, *Site of aminoacylation of tRNAs from Escherichia coli with respect to the 2'-or 3'-hydroxyl group of the terminal adenosine*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1975. 72(8): p. 3049-3053.
21. Yaremchuk, A., et al., *Class I tyrosyl-tRNA synthetase has a class II mode of cognate tRNA recognition*. *The EMBO Journal*, 2002. 21(14): p. 3829-3840.
22. Shitivelband, S. and Y.-M. Hou, *Breaking the stereo barrier of amino acid attachment to tRNA by a single nucleotide*. *Journal of molecular biology*, 2005. 348(3): p. 513-521.
23. Sprinzl, M., *Chemistry of aminoacylation and peptide bond formation on the 3' terminus of tRNA*. *Journal of biosciences*, 2006. 31(4): p. 489-496.

24. Manhas, R., V.S. Gowri, and R. Madhubala, *Leishmania donovani* encodes a functional selenocysteinyl-tRNA synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 2016. 291(3): p. 1203-1220.
25. Nozawa, K., et al., *Pyrolysyl-tRNA synthetase-tRNA Pyl structure reveals the molecular basis of orthogonality*. *Nature*, 2009. 457(7233): p. 1163.
26. Wan, W., J.M. Tharp, and W.R. Liu, *Pyrolysyl-tRNA synthetase: an ordinary enzyme but an outstanding genetic code expansion tool*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2014. 1844(6): p. 1059-1070.
27. de Pouplana, L.R. and P. Schimmel, *Two classes of tRNA synthetases suggested by sterically compatible dockings on tRNA acceptor stem*. *Cell*, 2001. 104(2): p. 191-193.
28. Schimmel, P. and L.R. de Pouplana, *Transfer RNA: from minihelix to genetic code*. *Cell*, 1995. 81(7): p. 983-986.
29. Ahel, I., et al., *Trans-editing of mischarged tRNAs*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. 100(26): p. 15422-15427.
30. Tamura, K., *Origin of amino acid homochirality: Relationship with the RNA world and origin of tRNA aminoacylation*. *Biosystems*, 2008. 92(1): p. 91-98.
31. Pauling, L., *Festschrift für Prof. Dr. Arthur Stoll*. 1958, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
32. Lofthfield, R.B. and D. Vanderjagt, *The frequency of errors in protein biosynthesis*. *Biochemical Journal*, 1972. 128(5): p. 1353.
33. Fersht, A., *Enzyme structure and mechanism*. W.H. Freeman and Co., San Francisco, New York., 1977.
34. Fersht, A.R., *Editing mechanisms in protein synthesis. Rejection of valine by the isoleucyl-tRNA synthetase*. *Biochemistry*, 1977. 16(5): p. 1025-1030.
35. Ling, J. and D. Söll, *Severe oxidative stress induces protein mistranslation through impairment of an aminoacyl-tRNA synthetase editing site*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. 107(9): p. 4028-4033.
36. Chaliotis, A., et al., *The complex evolutionary history of aminoacyl-tRNA synthetases*. *Nucleic acids research*, 2016. 45(3): p. 1059-1068.

37. Francklyn, C., *tRNA synthetase paralogs: evolutionary links in the transition from tRNA-dependent amino acid biosynthesis to de novo biosynthesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. 100(17): p. 9650-9652.
38. Beebe, K., L.R. de Pouplana, and P. Schimmel, *Elucidation of tRNA-dependent editing by a class II tRNA synthetase and significance for cell viability*. The EMBO Journal, 2003. 22(3): p. 668-675.
39. Soutourina, J., P. Plateau, and S. Blanquet, *Metabolism of D-Aminoacyl-tRNAs in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae Cells*. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(42): p. 32535-32542.
40. Bonnefond, L., R. Giegé, and J. Rudinger-Thirion, *Evolution of the tRNA Tyr/TyrRS aminoacylation systems*. Biochimie, 2005. 87(9): p. 873-883.
41. Wolf, Y.I., et al., *Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases—analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events*. Genome research, 1999. 9(8): p. 689-710.
42. Bonnefond, L., R. Giegé, and J. Rudinger-Thirion, *Evolution of the tRNA<sup>Tyr</sup>/TyrRS aminoacylation systems*. Biochimie, 2005. 87(9-10): p. 873-883.
43. Banik, S.D. and N. Nandi, *Chirality and Protein Biosynthesis*, in *Biochirality: Origins, Evolution and Molecular Recognition*, P. Cintas, Editor. 2012, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 255-305.
44. Sheoran, A. and E.A. First, *Activation of D-Tyrosine by Bacillus stearothermophilus Tyrosyl-tRNA Synthetase 2. Cooperative binding of ATP is limited to the initial turnover of the enzyme*. Journal of Biological Chemistry, 2008. 283(19): p. 12971-12980.
45. Naganuma, M., et al., *Unique protein architecture of alanyl-tRNA synthetase for aminoacylation, editing, and dimerization*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. 106(21): p. 8489-8494.
46. Guo, M., et al., *The C-Ala domain brings together editing and aminoacylation functions on one tRNA*. Science, 2009. 325(5941): p. 744-747.

47. Putney, S., R. Sauer, and P. Schimmel, *Purification and properties of alanine tRNA synthetase from Escherichia coli A tetramer of identical subunits*. Journal of Biological Chemistry, 1981. 256(1): p. 198-204.
48. Lechler, A., et al., *A biologically active 53 kDa fragment of overproduced alanyl-tRNA synthetase from Thermus thermophilus HB8 specifically interacts with tRNA<sup>Ala</sup> acceptor helix*. Nucleic acids research, 1997. 25(14): p. 2737-2744.
49. Dignam, S. and J. Dignam, *Glycyl- and alanyl-tRNA synthetases from Bombyx mori. Purification and properties*. Journal of Biological Chemistry, 1984. 259(7): p. 4043-4048.
50. Putney, S., D. Melendez, and P.R. Schimmel, *Cloning, partial sequencing, and in vitro transcription of the gene for alanine tRNA synthetase*. Journal of Biological Chemistry, 1981. 256(1): p. 205-211.
51. Jasin, M., L. Regan, and P. Schimmel, *Modular arrangement of functional domains along the sequence of an aminoacyl tRNA synthetase*. Nature, 1983. 306(5942): p. 441.
52. Wu, M.-X., et al., *A cysteine in the C-terminal region of alanyl-tRNA synthetase is important for aminoacylation activity*. Biochemistry, 1994. 33(40): p. 12260-12266.
53. Tsui, W.-C. and A.R. Fersht, *Probing the principles of amino acid selection using the alanyl-tRNA synthetase from Escherichia coli*. Nucleic acids research, 1981. 9(18): p. 4627-4637.
54. Swairjo, M.A., et al., *Alanyl-tRNA synthetase crystal structure and design for acceptor-stem recognition*. Molecular cell, 2004. 13(6): p. 829-841.
55. Guo, M., et al., *Paradox of mistranslation of serine for alanine caused by AlaRS recognition dilemma*. Nature, 2009. 462(7274): p. 808.
56. Guo, M., et al., *Introduction of a leucine half-zipper engenders multiple high-quality crystals of a recalcitrant tRNA synthetase*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2010. 66(3): p. 243-250.
57. Dignam, J.D., et al., *Allosteric interaction of nucleotides and tRNA<sup>Ala</sup> with E. coli alanyl-tRNA synthetase*. Biochemistry, 2011. 50(45): p. 9886-9900.

58. Beebe, K., et al., *Distinct domains of tRNA synthetase recognize the same base pair*. Nature, 2008. 451(7174): p. 90.
59. Naganuma, M., et al., *The selective tRNA aminoacylation mechanism based on a single G•U pair*. Nature, 2014. 510(7506): p. 507.
60. Sun, L., et al., *Evolutionary Gain of Alanine Mischarging to Noncognate tRNAs with a G4:U69 Base Pair*. Journal of the American Chemical Society, 2016. 138(39): p. 12948-12955.
61. Sun, L., et al., *Two crystal structures reveal design for repurposing the C-Ala domain of human AlaRS*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016. 113(50): p. 14300-14305.
62. Chong, Y.E., et al., *Distinct ways of G:U recognition by conserved tRNA binding motifs*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018: p. 201807109.
63. Tamura, K. and P. Schimmel, *Chiral-selective aminoacylation of an RNA minihelix*. Science, 2004. 305(5688): p. 1253-1253.
64. Tamura, K. and P.R. Schimmel, *Chiral-selective aminoacylation of an RNA minihelix: Mechanistic features and chiral suppression*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. 103(37): p. 13750-13752.
65. Kvenvolden, K.A., J.G. Lawless, and C. Ponnampereuma, *Nonprotein amino acids in the Murchison meteorite*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1971. 68(2): p. 486-490.
66. Kvenvolden, K., et al., *Evidence for extraterrestrial amino-acids and hydrocarbons in the Murchison meteorite*. Nature, 1970. 228(5275): p. 923.
67. Weber, A.L. and S.L. Miller, *Reasons for the occurrence of the twenty coded protein amino acids*. Journal of molecular evolution, 1981. 17(5): p. 273-284.
68. HAMASE, K., et al., *Enantioselective determination of extraterrestrial amino acids using a two-dimensional chiral high-performance liquid chromatographic system*. Chromatography, 2014. 35(2): p. 103-110.
69. Sela, M. and E. Zisman, *Different roles of D-amino acids in immune phenomena*. The FASEB Journal, 1997. 11(6): p. 449-456.



70. Hashimoto, A. and T. Oka, *Free D-aspartate and D-serine in the mammalian brain and periphery*. Progress in neurobiology, 1997. 52(4): p. 325-353.
71. Hashimoto, A., et al., *The presence of free D-serine in rat brain*. FEBS letters, 1992. 296(1): p. 33-36.
72. Fisher, G.H., et al., *Free D-aspartate and D-alanine in normal and Alzheimer brain*. Brain research bulletin, 1991. 26(6): p. 983-985.
73. Radkov, A.D. and L.A. Moe, *Bacterial synthesis of D-amino acids*. Applied microbiology and biotechnology, 2014. 98(12): p. 5363-5374.
74. Cava, F., et al., *Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria*. Cellular and molecular life sciences, 2011. 68(5): p. 817-831.
75. Lam, H., et al., *D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria*. Science, 2009. 325(5947): p. 1552-1555.
76. Kirschner, D.L. and T.K. Green, *Separation and sensitive detection of D-amino acids in biological matrices*. Journal of separation science, 2009. 32(13): p. 2305-2318.
77. Schieber, A., H. Brückner, and J.R. Ling, *Gc-ms analysis of diaminopimelic acid stereoisomers and amino acid enantiomers in rumen bacteria*. Biomedical Chromatography, 1999. 13(1): p. 46-50.
78. Corrigan, J.J., *D-amino acids in animals*. Science, 1969. 164(3876): p. 142-149.
79. Leiman, S.A., et al., *D-amino acids indirectly inhibit biofilm formation in Bacillus subtilis by interfering with protein synthesis*. Journal of bacteriology, 2013. 195(23): p. 5391-5395.
80. Fujii, N., *D-amino acid in elderly tissues*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2005. 28(9): p. 1585-1589.
81. Liu, W., et al., *D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup> Deacylase, a New Role in Alzheimer's-associated Disease in SAMP8 Mice*. Chinese Medical Sciences Journal, 2010. 25(2): p. 90-94.

82. Friedman, M. and M.R. Gumbmann, *The nutritive value and safety of D-phenylalanine and D-tyrosine in mice*. The Journal of nutrition, 1984. 114(11): p. 2089-2096.
83. Friedman, M., *Formation, nutritional value, and safety of D-amino acids*, in *Nutritional and Toxicological Consequences of Food Processing*. 1991, Springer. p. 447-481.
84. Friedman, M., *Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids*. Journal of agricultural and food chemistry, 1999. 47(9): p. 3457-3479.
85. Friedman, M., *Origin, Microbiology, Nutrition, and Pharmacology of D-Amino Acids*. Chemistry & biodiversity, 2010. 7(6): p. 1491-1530.
86. Du, S., et al., *Altered profiles and metabolism of L-and D-amino acids in cultured human breast cancer cells vs. non-tumorigenic human breast epithelial cells*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2019. 164: p. 421-429.
87. Nixon, S.L. and C.S. Cockell, *Nonproteinogenic D-amino acids at millimolar concentrations are a toxin for anaerobic microorganisms relevant to early earth and other anoxic planets*. Astrobiology, 2015. 15(3): p. 238-246.
88. Moore, B.C. and J.A. Leigh, *Markerless mutagenesis in Methanococcus maripaludis demonstrates roles for alanine dehydrogenase, alanine racemase, and alanine permease*. Journal of bacteriology, 2005. 187(3): p. 972-979.
89. Uo, T., et al., *Functional Characterization of Alanine Racemase from Schizosaccharomyces pombe: a Eucaryotic Counterpart to Bacterial Alanine Racemase*. Journal of bacteriology, 2001. 183(7): p. 2226-2233.
90. Sasabe, J. and M. Suzuki, *Distinctive roles of d-Amino acids in the homochiral world: Chirality of amino acids modulates mammalian physiology and pathology*. The Keio journal of medicine, 2018.
91. Matsumoto, M., et al., *Free D-amino acids produced by commensal bacteria in the colonic lumen*. Scientific Reports, 2018. 8(1): p. 17915.
92. Kuncha, S.K., S.P. Kruparani, and R. Sankaranarayanan, *Chiral checkpoints during protein biosynthesis*. Journal of Biological Chemistry, 2019: p. jbc. REV119. 008166.

93. Reaveley, D. and R. Burge, *Walls and membranes in bacteria*, in *Advances in microbial physiology*. 1972, Elsevier. p. 1-81.
94. Llamas-Saiz, A.L., et al., *Double-stranded helical twisted  $\beta$ -sheet channels in crystals of gramicidin S grown in the presence of trifluoroacetic and hydrochloric acids*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2007. 63(3): p. 401-407.
95. Burkhart, B.M., et al., *Gramicidin D conformation, dynamics and membrane ion transport*. *Peptide Science*, 1999. 51(2): p. 129-144.
96. Wallace, B., *Structure of gramicidin A*. *Biophysical journal*, 1986. 49(1): p. 295-306.
97. Urry, D., *The gramicidin A transmembrane channel: a proposed  $\pi$  (L, D) helix*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1971. 68(3): p. 672-676.
98. Hochbaum, A.I., et al., *Inhibitory effects of D-amino acids on Staphylococcus aureus biofilm development*. *Journal of bacteriology*, 2011. 193(20): p. 5616-5622.
99. Ghssein, G., et al., *Biosynthesis of a broad-spectrum nicotianamine-like metallophore in Staphylococcus aureus*. *Science*, 2016. 352(6289): p. 1105-1109.
100. Nagata, Y., et al., *Occurrence of D-amino acids in a few archaea and dehydrogenase activities in hyperthermophile Pyrobaculum islandicum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1999. 1435(1-2): p. 160-166.
101. Erspamer, V., et al., *Pharmacological studies of 'sapo' from the frog Phyllomedusa bicolor skin: a drug used by the Peruvian Matsigenka Indians in shamanic hunting practices*. *Toxicon*, 1993. 31(9): p. 1099-1111.
102. Erspamer, V., et al., *Deltorphins: a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for delta opioid binding sites*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989. 86(13): p. 5188-5192.
103. Jacobsen, R., et al., *The contryphans, ad-trvptophan-containing family of Conus peptides: interconversion between conformers*. *The Journal of peptide research*, 1998. 51(3): p. 173-179.

104. Meroni, G., M. Rajabi, and E. Santaniello, *D-Luciferin, derivatives and analogues: synthesis and in vitro/in vivo luciferase-catalyzed bioluminescent activity*. ARKIVOC: Online Journal of Organic Chemistry, 2009.
105. Abe, H., et al., *Physiological function and metabolism of free D-alanine in aquatic animals*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2005. 28(9): p. 1571-1577.
106. Ito, T., et al., *Serine racemase is involved in d-aspartate biosynthesis*. The Journal of Biochemistry, 2016. 160(6): p. 345-353.
107. Roher, A.E., et al., *Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease*. Journal of Biological Chemistry, 1993. 268(5): p. 3072-3083.
108. Mothet, J.-P., et al., *D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. 97(9): p. 4926-4931.
109. Michard, E., et al., *Glutamate receptor-like genes form Ca<sup>2+</sup> channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine*. Science, 2011. 332(6028): p. 434-437.
110. Ogston, A., *Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements*. Nature, 1948. 162(4129): p. 963.
111. Easson, L.H. and E. Stedman, *Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action: Molecular dissymmetry and physiological activity*. Biochemical Journal, 1933. 27(4): p. 1257.
112. Mesecar, A.D. and D.E. Koshland Jr, *Structural biology: A new model for protein stereospecificity*. Nature, 2000. 403(6770): p. 614.
113. Banik, S.D. and N. Nandi, *Chirality and protein biosynthesis*, in *Biochirality*. 2012, Springer. p. 255-305.
114. Conway, T.W., E.M. Lansford, and W. Shive, *Purification and substrate specificity of a phenylalanine-activating enzyme from Escherichia coli 9723*. Journal of Biological Chemistry, 1962. 237(9): p. 2850-2854.

115. Englander, M.T., et al., *The ribosome can discriminate the chirality of amino acids within its peptidyl-transferase center*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. 112(19): p. 6038-6043.
116. Fleisher, R.C., V.W. Cornish, and R.L. Gonzalez Jr, *D-amino acid-mediated translation arrest is modulated by the identity of the incoming aminoacyl-tRNA*. Biochemistry, 2018. 57(29): p. 4241-4246.
117. Martinis, S.A., et al., *Aminoacyl-tRNA synthetases: a new image for a classical family*. Biochimie, 1999. 81(7): p. 683-700.
118. Schimmel, P. and L.s.R. de Poupplana, *Footprints of aminoacyl-tRNA synthetases are everywhere*. Trends in biochemical sciences, 2000. 25(5): p. 207-209.
119. Jakubowski, H., *Accuracy of aminoacyl-tRNA synthetases: proofreading of amino acids*. The Aminoacyl-tRNA Synthetases, 2005: p. 384-396.
120. Perona, J.J. and I. Gruic-Sovulj, *Synthetic and editing mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetases*, in *Aminoacyl-tRNA Synthetases in Biology and Medicine*. 2013, Springer Netherlands. p. 1-41.
121. Martinis, S.A. and M.T. Boniecki, *The balance between pre-and post-transfer editing in tRNA synthetases*. FEBS letters, 2010. 584(2): p. 455-459.
122. Chong, Y.E., X.-L. Yang, and P. Schimmel, *Natural homolog of tRNA synthetase editing domain rescues conditional lethality caused by mistranslation*. Journal of Biological Chemistry, 2008. 283(44): p. 30073-30078.
123. Sokabe, M., et al., *Molecular basis of alanine discrimination in editing site*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. 102(33): p. 11669-11674.
124. Ruan, B. and D. Söll, *The Bacterial YbaK Protein Is a Cys-tRNA<sup>Pro</sup> and Cys-tRNA<sup>Cys</sup> Deacylase*. Journal of Biological Chemistry, 2005. 280(27): p. 25887-25891.
125. An, S. and K. Musier-Forsyth, *Trans-editing of Cys-tRNA<sup>Pro</sup> by Haemophilus influenzae YbaK protein*. Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(41): p. 42359-42362.

126. Kumar, S., et al., *Aminoacyl-tRNA substrate and enzyme backbone atoms contribute to translational quality control by YbaK*. The Journal of Physical Chemistry B, 2012. 117(16): p. 4521-4527.

127. Ferri-Fioni, M.-L., et al., *Structure of Crystallized-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup> Deacylase. A representative of a new class of tRNA-dependent hydrolases*. Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(50): p. 47285-47290.

128. Ferri-Fioni, M.-L., et al., *Identification in Archaea of a Novel D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup> Deacylase*. Journal of Biological Chemistry, 2006. 281(37): p. 27575-27585.

129. Wydau, S., et al., *GEK1, a gene product of Arabidopsis thaliana involved in ethanol tolerance, is a D-aminoacyl-tRNA deacylase*. Nucleic acids research, 2007. 35(3): p. 930-938.

130. Wydau, S., et al., *Widespread distribution of cell defense against D-aminoacyl-tRNAs*. Journal of Biological Chemistry, 2009. 284(21): p. 14096-14104.

131. Zheng, G., Liu, Wei, Gong, Yanhua, Yang, Hongbo, Yin, Bin, Zhu, Jingxi, Xie, Yi, Peng, Xiaozhong, Qiang, Boqin, Yuan, Jiangang, *Human D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup> deacylase contributes to the resistance of the cell to D-amino acids*. Biochem J, 2009(417): p. 85-94.

132. Dale, T. and O.C. Uhlenbeck, *Amino acid specificity in translation*. Trends in biochemical sciences, 2005. 30(12): p. 659-665.

133. Routh, S.B., et al., *Elongation Factor Tu Prevents Misediting of Gly-tRNA<sup>(Gly)</sup> Caused by the Design Behind the Chiral Proofreading Site of D-Aminoacyl-tRNA Deacylase*. PLoS Biol, 2016. 14(5): p. e1002465.

134. Effraim, P.R., et al., *Natural amino acids do not require their native tRNAs for efficient selection by the ribosome*. Nature chemical biology, 2009. 5(12): p. 947-953.

135. Ling, J., S.S. Yadavalli, and M. Ibba, *Phenylalanyl-tRNA synthetase editing defects result in efficient mistranslation of phenylalanine codons as tyrosine*. RNA, 2007. 13(11): p. 1881-1886.

136. Li, E., et al., *D-Phenylalanine inhibits biofilm development of a marine microbe Pseudoalteromonas sp. SC2014*. FEMS Microbiology Letters, 2016. 363(18).
137. Soutourina, O., et al., *Formation of D-tyrosyl-tRNA<sup>Tyr</sup> accounts for the toxicity of D-tyrosine toward Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(41): p. 42560-42565.
138. Leiman, S.A., et al., *Identification and characterization of mutations conferring resistance to D-amino acids in Bacillus subtilis*. Journal of bacteriology, 2015. 197(9): p. 1632-1639.
139. Sheoran, A., G. Sharma, and E.A. First, *Activation of D-Tyrosine by Bacillus stearothermophilus Tyrosyl-tRNA Synthetase 1. Pre-steady-state kinetic analysis reveals the mechanistic basis for the recognition of D-tyrosine*. Journal of Biological Chemistry, 2008. 283(19): p. 12960-12970.
140. Williams-Wagner, R.N., et al., *The Bacillus subtilis tyrZ gene encodes a highly selective tyrosyl-tRNA synthetase and is regulated by a MarR regulator and T box riboswitch*. Journal of bacteriology, 2015. 197(9): p. 1624-1631.
141. Simonson, T., et al., *Redesigning the stereospecificity of tyrosyl-tRNA synthetase*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2016. 84(2): p. 240-253.
142. Druart, K., et al., *Probing the stereospecificity of tyrosyl-and glutaminyl-tRNA synthetase with molecular dynamics*. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2017. 71: p. 192-199.
143. Richardson, C.J. and E.A. First, *Altering the enantioselectivity of Tyrosyl-tRNA synthetase by insertion of a stereospecific editing domain*. Biochemistry, 2016. 55(10): p. 1541-1553.
144. Richardson, C.J. and E.A. First, *Hyperactive editing domain variants switch the stereospecificity of Tyrosyl-tRNA synthetase*. Biochemistry, 2016. 55(17): p. 2526-2537.

145. Ling, J., H. Roy, and M. Ibba, *Mechanism of tRNA-dependent editing in translational quality control*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. 104(1): p. 72-77.
146. Tworowski, D., et al., *Universal pathway for posttransfer editing reactions: Insights from the crystal structure of TtPheRS with puromycin*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015: p. 201414852.
147. Kumar, S., et al., *Substrate and enzyme functional groups contribute to translational quality control by bacterial prolyl-tRNA synthetase*. The Journal of Physical Chemistry B, 2012. 116(23): p. 6991-6999.
148. Boyarshin, K.S., et al., *A new mechanism of post-transfer editing by aminoacyl-tRNA synthetases: catalysis of hydrolytic reaction by bacterial-type prolyl-tRNA synthetase*. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2017. 35(3): p. 669-682.
149. Hagiwara, Y., et al., *Editing mechanism of aminoacyl-tRNA synthetases operates by a hybrid ribozyme/protein catalyst*. Journal of the American Chemical Society, 2010. 132(8): p. 2751-2758.
150. Boero, M., *LeuRS synthetase: a first-principles investigation of the water-mediated editing reaction*. The Journal of Physical Chemistry B, 2011. 115(42): p. 12276-12286.
151. Ahmad, S., et al., *Specificity and catalysis hardwired at the RNA-protein interface in a translational proofreading enzyme*. Nature communications, 2015. 6: p. 7552.
152. Aboelnga, M.M., J.J. Hayward, and J.W. Gault, *Unraveling the Critical Role Played by Ado762' OH in the Post-Transfer Editing by Archaeal Threonyl-tRNA Synthetase*. The Journal of Physical Chemistry B, 2018. 122(3): p. 1092-1101.
153. Soutourina, J., et al., *Functional Characterization of the D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup> Deacylase from Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(27): p. 19109-19114.



154. Soutourina, J., S. Blanquet, and P. Plateau, *d-Tyrosyl-tRNATyr Metabolism in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(16): p. 11626-11630.
155. Lim, K., et al., *A Catalytic Mechanism for d-Tyr-tRNATyr Deacylase Based on the Crystal Structure of Hemophilus influenzae HI0670*. Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(15): p. 13496-13502.
156. Pawar, K.I., et al., *Role of D-aminoacyl-tRNA deacylase beyond chiral proofreading as a cellular defense against glycine mischarging by AlaRS*. eLife, 2017. 6.
157. Rybak, M.Y., O.P. Kovalenko, and M.A. Tukalo, *The Dual Role of the 2'-OH Group of A76 tRNATyr in the Prevention of d-tyrosine Mistranslation*. Journal of molecular biology, 2018. 430(17): p. 2670-2676.
158. Kuncha, S.K., et al., *A chiral selectivity relaxed paralog of DTD for proofreading tRNA mischarging in Animalia*. Nature communications, 2018. 9(1): p. 511.
159. Dwivedi, S., S.P. Kruparani, and R. Sankaranarayanan, *A D-amino acid editing module coupled to the translational apparatus in archaea*. Nature structural & molecular biology, 2005. 12(6): p. 556-557.
160. Ahmad, S., et al., *Mechanism of chiral proofreading during translation of the genetic code*. eLife, 2013. 2.
161. Bhatt, T.K., et al., *Ligand-bound structures provide atomic snapshots for the catalytic mechanism of D-amino acid deacylase*. Journal of Biological Chemistry, 2010. 285(8): p. 5917-5930.
162. da Silva, P.L., L. Guimarães, and J.R. Pliego, *Revisiting the Mechanism of Neutral Hydrolysis of Esters: Water Autoionization Mechanisms with Acid or Base Initiation Pathways*. The Journal of Physical Chemistry B, 2013. 117(21): p. 6487-6497.
163. Ilchenko, M., et al., *Substrate-assisted mechanism of catalytic hydrolysis of misaminoacylated tRNA required for protein synthesis fidelity*. Biochemical Journal, 2019. 476(4): p. 719-732.

164. Marmur, J., *A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms*. Journal of molecular biology, 1961. 3(2): p. 208-IN1.
165. Nordin, B.E. and P. Schimmel, *Plasticity of recognition of the 3'-end of mischarged tRNA by class I aminoacyl-tRNA synthetases*. Journal of Biological Chemistry, 2002. 277(23): p. 20510-20517.
166. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. 72(1-2): p. 248-254.
167. Zerbs, S., A.M. Frank, and F.R. Collart, *Bacterial systems for production of heterologous proteins*. Methods in enzymology, 2009. 463: p. 149-168.
168. Waugh, D.S., *An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags*. Protein expression and purification, 2011. 80(2): p. 283-293.
169. Fukunaga, R. and S. Yokoyama, *Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of alanyl-tRNA synthetase from the archaeon Archaeoglobus fulgidus*. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2007. 63(3): p. 224-228.
170. Cvetesic, N., J.J. Perona, and I. Gruic-Sovulj, *Kinetic partitioning between synthetic and editing pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases occurs at both pre-transfer and post-transfer hydrolytic steps*. Journal of Biological Chemistry, 2012. 287(30): p. 25381-25394.
171. Ledoux, S. and O.C. Uhlenbeck, *[3'-32 P]-labeling tRNA with nucleotidyltransferase for assaying aminoacylation and peptide bond formation*. Methods, 2008. 44(2): p. 74-80.
172. Xin, Y., W. Li, and E.A. First, *The 'KMSKS' Motif in Tyrosyl-tRNA Synthetase Participates in the Initial Binding of tRNA<sup>Tyr</sup>*. Biochemistry, 2000. 39(2): p. 340-347.
173. Tan, M., et al., *tRNA-dependent pre-transfer editing by prokaryotic leucyl-tRNA synthetase*. Journal of Biological Chemistry, 2010. 285(5): p. 3235-3244.

174. Pasman, Z., et al., *Substrate specificity and catalysis by the editing active site of alanyl-tRNA synthetase from Escherichia coli*. *Biochemistry*, 2011. 50(9): p. 1474-1482.
175. Francklyn, C.S., et al., *Methods for kinetic and thermodynamic analysis of aminoacyl-tRNA synthetases*. *Methods*, 2008. 44(2): p. 100-118.
176. Sankaranarayanan, R., et al., *The structure of threonyl-tRNA synthetase-tRNA<sup>Thr</sup> complex enlightens its repressor activity and reveals an essential zinc ion in the active site*. *Cell*, 1999. 97(3): p. 371-381.
177. Novoa, E.M., et al., *Ancestral AlaX Editing Enzymes for Control of Genetic Code Fidelity are not tRNA Specific*. *Journal of Biological Chemistry*, 2015: p. jbc. M115. 640060.
178. Wolfson, A.D. and O.C. Uhlenbeck, *Modulation of tRNA<sup>Ala</sup> identity by inorganic pyrophosphatase*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. 99(9): p. 5965-5970.
179. Rybak, M.Y., et al., *Stereospecificity control in aminoacyl-tRNA-synthetases: new evidence of d-amino acids activation and editing*. *Nucleic acids research*, 2019. 47(18): p. 9777-9788.
180. Polayes, D., *Prokaryotic protein expression and purification with the ProEX HT expression system*. *Focus*, 1996. 18(2): p. 50-53.
181. The UniProt Consortium, *UniProt: the universal protein knowledgebase*. *Nucleic acids research*, 2017. 45(D1): p. D158-D169.
182. Spiwok, V., *CH/ $\pi$  interactions in carbohydrate recognition*. *Molecules*, 2017. 22(7): p. 1038.
183. Nelson, D.L., A.L. Lehninger, and M.M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*. 2008: Macmillan.
184. Harris, T.K. and G.J. Turner, *Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites*. *IUBMB life*, 2002. 53(2): p. 85-98.
185. Hermanson, G.T., *Bioconjugate techniques*. 2013: Academic press.

186. Grimsley, G.R., J.M. Scholtz, and C.N. Pace, *A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins*. Protein Science, 2009. 18(1): p. 247-251.
187. Oregioni, A., et al., *Determination of the pKa of the N-terminal amino group of ubiquitin by NMR*. Scientific Reports, 2017. 7: p. 43748.
188. Gómez-Bombarelli, R., E. Calle, and J. Casado, *Mechanisms of lactone hydrolysis in neutral and alkaline conditions*. The Journal of Organic Chemistry, 2013. 78(14): p. 6868-6879.
189. Hsieh, Y.-H., N. Weinberg, and S. Wolfe, *The neutral hydrolysis of methyl acetate—Part 1. Kinetic experiments*. Canadian Journal of Chemistry, 2009. 87(4): p. 539-543.
190. Rogers, S.O., *Evolution of the genetic code based on conservative changes of codons, amino acids, and aminoacyl tRNA synthetases*. Journal of theoretical biology, 2019. 466: p. 1-10.
191. Cleaves II, H.J., *The origin of the biologically coded amino acids*. Journal of theoretical biology, 2010. 263(4): p. 490-498.
192. Johnson, A.P., et al., *The Miller volcanic spark discharge experiment*. Science, 2008. 322(5900): p. 404-404.
193. Miller, S.L., *A production of amino acids under possible primitive earth conditions*. Science, 1953. 117(3046): p. 528-529.
194. Cronin, J. and S. Pizzarello, *Amino acids in meteorites*. Advances in Space Research, 1983. 3(9): p. 5-18.
195. Shibue, R., et al., *Comprehensive reduction of amino acid set in a protein suggests the importance of prebiotic amino acids for stable proteins*. Scientific Reports, 2018. 8(1): p. 1227.
196. Shepherd, J. and M. Ibba, *Translation quality control is maintained by the penicillin resistance factor MurM in Streptococcus pneumoniae*. Journal of Biological Chemistry, 2013: p. jbc. M113. 479824.
197. Filipe, S.R., M.G. Pinho, and A. Tomasz, *Characterization of the murMN operon involved in the synthesis of branched peptidoglycan peptides in*

*Streptococcus pneumoniae*. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(36): p. 27768-27774.

198. Cressina, E., et al., *Inhibition of tRNA-dependent ligase MurM from Streptococcus pneumoniae by phosphonate and sulfonamide inhibitors*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2009. 17(9): p. 3443-3455.

199. Aggarwal, S.D., et al., *A Molecular Link between Cell Wall Modification and Stringent Response in a Gram-positive Bacteria*. bioRxiv, 2019: p. 622340.

200. Hegde, S.S. and T.E. Shrader, *FemABX family members are novel nonribosomal peptidyltransferases and important pathogen-specific drug targets*. Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(10): p. 6998-7003.

201. Hegde, S.S. and J.S. Blanchard, *Kinetic and mechanistic characterization of recombinant Lactobacillus viridescens FemX (UDP-N-acetylmuramoyl pentapeptide-lysine N6-alanyltransferase)*. Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(25): p. 22861-22867.

202. Villet, R., et al., *Idiosyncratic features in tRNAs participating in bacterial cell wall synthesis*. Nucleic acids research, 2007. 35(20): p. 6870-6883.

203. Fonvielle, M., et al., *Aminoacyl-tRNA recognition by the FemX Wv transferase for bacterial cell wall synthesis*. Nucleic acids research, 2009. 37(5): p. 1589-1601.

## ДОДАТОК А

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<sup>Tyr</sup>-deacylase from *Thermus thermophilus*. *Biopolymers & Cell*, 31 (3), 179-186. DOI: 10.7124/bc.0008DE.
2. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O. P., Tukalo M. A. (2018) The Dual Role of the 2'-OH Group of A76 tRNA<sup>Tyr</sup> in the Prevention of D-tyrosine Mistranslation. *Journal of molecular biology*, 430 (17), 2670-2676. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.06.036.
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.
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.
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.
6. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2014) Cloning, expression and purification of D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>-deacylase (DTD) from *Thermus thermophilus*. – Materials of XI Ukrainian biochemical congress, 6-10 October 2014, Kyiv. – *Ukr. Biochem. J.*, 2014, Vol.86, №5 (Suppl. 1), P.74-75.
7. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O. P., Kriklyvyi I. A., Tukalo M. A. (2015) Cloning, expression and purification of D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>-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. – *Biopolymers and Cell*, 2015, 31 (Special Issue), P.9.

8. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2015) D-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>-deacylase from *Thermus thermophilus* (DTDDT): cloning, expression, purification and detection of editing activity. – International Conference of the Young Scientists (CYS-2015), 21-25 September, Kyiv. – *Abstract book*, P. 39.

9. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2016) 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. – *Biopolymers and Cell*, 2016, Vol. 32, № 5, P. 403.

10. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2016) 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. – *Acta biochimica polonica*, Vol. 63, Suppl., 1/2016, P. 43.

11. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2016) 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. – *Biopolymers and Cell*, 2016, Vol. 32, № 4, P. 317.

12. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Rayevsky A., Tukalo M. (2017) 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” & 2<sup>nd</sup> Conference for young scientists of the division of Biochemistry, physiology and Molecular Biology NAS of Ukraine (CYS-2017), 6-9 June 2017, Kyiv. – *Ukr. Biochem. J.*, 2017, Vol. 89, №3, P. 108. DOI: 10.15407/ubj89.03.

13. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Rayevsky A., Tukalo M. (2017) 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. – *FEBS journal* 2017, 284, P. 293-294. DOI: 10.1111/febs.14174.

14. **Rybak M. Yu.** (2018) The role of 2'- and 3'-hydroxyl groups of A76 tRNA<sup>Tyr</sup> at the first steps of translation quality control. – Conference of Young Scientists “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology”, 23-25 May 2018, Kyiv. – *Ukr. Biochem. J.*, 2018, Vol. 90, № 3, P.133.

15. **Rybak M. Yu.**, Tukalo M. A. (2018) Chirality during protein biosynthesis: the role of hydroxyl groups of tRNA<sup>Tyr</sup> 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. – *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) 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. – *Abstract book*, P. 61-62.

17. **Rybak M. Yu.**, Kovalenko O., Tukalo M. (2018) The dual role of the 2'-OH group of A76 tRNA<sup>Tyr</sup> in the discrimination of D-Tyrosine during the first steps of translation. – 27<sup>th</sup> tRNA Conference, 23-28 September 2018, Strasbourg, France. – *Abstract book*, P. 185.

18. Tukalo M., Kovalenko O., **Rybak M. Yu.**, Rayevsky A., Ilchenko M., Gudzera O., Kriklivyi I., Yaremchuk G., Dubey I. (2018) tRNA-dependent mechanism of the errors editing in translation quality control. – 27<sup>th</sup> tRNA Conference, 23-28 September 2018, Strasbourg, France. – *Abstract book*, P. 189.



19. **Rybak M. Yu.**, Kovalchuk A., Volynets G. (2018) 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. – *Abstract book*, P. 7-8.

20. **Rybak M. Yu.**, Volynets G., Kovalenko O., Starosyla S., Bdzhola V., Gudzera O., Yarmoluk S. and Tukalo M. (2019) 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. – *Abstract book*, P. 87.

21. **Rybak M. Yu.**, Rayevsky A. V., Tukalo M. A. (2019) Establishing of the chiral selectivity in translation apparatus: the role of *cis*- and *trans*-editing factors. – XII Ukrainian biochemical congress, devoted 165-anniversary to I. Ya. Gorbachevskiy, 30 September-4 October 2019, Ternopil. – *Medical and Clinical Chemistry*, Vol. 21, №3 (Supplement), P. 43-44.

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