



УДК 577.152.6

КОНФОРМАЦІЙНА РУХЛИВІСТЬ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ ЕУБАКТЕРІЇ *M. tuberculosis* ПО ДАНИМ КОМП'ЮТЕРНОГО МОДЕЛЮВАННЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДИНАМІКИ

¹Микуляк В.В., ^{1,2}Корнелюк О.І.

¹Інститут високих технологій, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна;

²Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, Київ, Україна;

e-mail: v.mykuliak@gmail.com

Надійшла до редакції 27.09.2011

Тирозил-тРНК синтетаза еубактерії *M. tuberculosis* (MtTyrRS) є ферментом, який каталізує приєднання тирозину до гомологічної тРНК на дорибосомному етапі синтезу білка у бактерій. Інгібування MtTyrRS може суттєво інгібувати ріст патогенних бактерій, тому MtTyrRS є перспективною мішенню для розробки нових протитуберкульозних препаратів, оскільки не здатна до перехресного розпізнавання та аміноацилювання цитоплазматичної тРНК^{Tyr} людини. В роботі проведено моделювання молекулярної динаміки (МД) димера MtTyrRS в розчині при умовах, наближених до фізіологічних, в часовому інтервалі 90 нс з використанням комп'ютерних ґрід-технологій та сервісів віртуальної лабораторії MolDynGrid. Отримані дані про високу антисиметричну конформаційну рухливість С-модулів відносно каталітичних N-модулів синтетази завдяки конформаційній гнучкості неструктурованого міжмодульного лінкера. Виявлена також висока конформаційна рухливість амінокислотних залишків в неструктурованій каталітичній петлі активного центра фермента, причому в процесі МД каталітична петля здатна формувати два антипаралельні динамічні β -стренди.

Ключові слова: тирозил-тРНК синтетаза *Mycobacterium tuberculosis*, молекулярна динаміка, GROMACS, ґрід-технології.

ВСТУП

Туберкульоз залишається однією з провідних причин смертності, причому майже третина світового населення інфікована збудником - патогенною еубактерією *Mycobacterium tuberculosis*. Щорічно приблизно у 8 млн. людей розвивається активний туберкульоз, що призводить до смерті 2 млн. людей у світі. Застосовувані сьогодні лікарські засоби вимагають призначення комбінації декількох протитуберкульозних препаратів, щонайменше, протягом 6 місяців. Ситуація ускладнюється швидкою появою нових резистентних штамів *M. tuberculosis*. Отже, зараз відчувається гострий брак нових протитуберкульозних препаратів [1]. Для цього необхідно здійснювати пошук нових білків-мішеней, інгібітори яких можуть бути новими протитуберкульозними лікарськими препаратами. Перспективним шляхом вирішення цієї проблеми є розробка нових ефективних інгібіторів бактеріальних аміноацил-тРНК синтетаз (aaRS) – ключових ферментів [2-4].

Тирозил-тРНК синтетаза еубактерії *M. tuberculosis* (MtTyrRS) є ферментом 1-го класу аміноацил-тРНК синтетаз, що каталізує високоспецифічне приєднання тирозину до гомологічної йому тРНК. Ця реакція є АТР-залежною, і відбувається в два етапи. На першому етапі з ферментом зв'язується тирозин та АТР, і утворюється проміжний продукт реакції естерифікації тирозиладенілат та вивільняється пірофосфат. На другому етапі, до MtTyrRS приєднується тирозил-тРНК і відбувається ковалентне приєднання до неї тирозину, після чого від фермента відщеплюється AMP та навантажена амінокислотою тирозил-тРНК^{Tyr} [5]. TyrRS еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* (MtTyrRS) є гомодимером, що складається з двох ідентичних субодиниць. В структурі кожної субодиниці є N-кінцевий модуль і з'єднаний з ним через гнучкий лінкер С-кінцевий модуль [6]. N-кінцевий модуль в свою чергу складається з каталітичного та антикодонзв'язуючого доменів. Подібно всім аміноацил-тРНК синтетазам 1-го структурного класу, MtTyrRS містить згортку Россмана в активному центрі фермента та два

висококонсервативні каталітично важливі мотиви HIGH та KMSKS [5,7].

Інгібування ферментативної активності *MtTyrRS* є потенційним шляхом для пошуку і розробки нових ефективних і нетоксичних лікарських препаратів проти туберкульозу. Це обумовлено, по-перше, тим, що *TyrRS* належить до найбільш життєво-важливих білків клітини, а її інгібування має ефективно пригнічувати ріст патогенних бактерій, і по-друге, структура *MtTyrRS* значно відрізняється від цитоплазматичної *TyrRS* людини, яка має інший (еукаріотичний) тип просторової структури і значні відмінності в будові активного центру. Слід зазначити, що гомологія амінокислотних послідовностей цих двох *TyrRS* з різних організмів становить менше 20%. Важливо також відмітити, що *TyrRS* прокариотичного і еукаріотичного типів не здатні до перехресного розпізнавання та аміноацилювання відповідних тРНК^{Tyr} [4].

Важливим аспектом при розробці нових інгібіторів ферментів є врахування динамічної структури білка і, особливо, динаміки його активного центра. Для цього необхідні детальні дослідження конформаційної рухливості білка в розчині в умовах, близьких до фізіологічних. Одним з найбільш ефективних методів вивчення динаміки білків в розчині зараз є метод комп'ютерного моделювання молекулярної динаміки (МД), який широко застосовується для дослідження особливостей функціонування біомолекул, в тому числі aaRS [8]. Слід зазначити, що використання сучасних комп'ютерних ґрид-технологій суттєво розширює можливості метода МД і дозволяє проводити розрахунки динаміки систем, які містять сотні тисяч атомів, у відносно довгих часових інтервалах.

В даній роботі проведено моделювання МД *in silico* димера *MtTyrRS* в розчині в часовому інтервалі 90 нс при умовах, наближених до фізіологічних. Отримані результати вказують на високу рухливість С-модулів синтетази відносно N-модулів завдяки конформаційній гнучкості міжмодульного лінкера, а також на рухливість є каталітичної неструктурованої петлі, яка містить структурний мотив KMSKS.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Розрахунки молекулярної динаміки в довгих часових інтервалах проведені з використанням ресурсів Українського Національного Ґриду, в тому числі використано 36 ядер суперкомп'ютера SKIT-3 Інституту кібернетики НАН України. Постановка задачі, її обрахунок та отримання було проведено з використанням сервісів віртуальної лабораторії MolDynGrid (<http://moldyngrid.org>) [9,10].

Для моделювання використано неповну просторову структуру *MtTyrRS*, визначену методом рентгеноструктурного аналізу (Protein Data Bank (PDB) код 2JAN) із роздільною здатністю 2,9 Å, проте в цій структурі відсутні деякі фрагменти

поліпептидного ланцюга. Для добудови відсутніх амінокислотних залишків в структурі петель субодиниці A: Met1-Met4 та Gly424; та субодиниці B: Met1-Met4 та Pro81-Asp93 в *MtTyrRS* було використано спеціалізований веб-сервер ModLoop [11,12], розроблений спеціально для добудови петель в білкових структурах. Оцінка якості структури проводилась за допомогою веб-сервера MolProbity [13]. З метою оптимізації отриманої структури, було проведено мінімізацію енергії білка за допомогою веб-сервера YASARA Energy Minimization Server [14]. Після мінімізації енергії знову було проведено оцінку якості отриманої просторової структури білка.

Розрахунки молекулярної динаміки *MtTyrRS* проводили за допомогою версії пакета програм GROMACS 4.5.1 [15]. Координати структури *MtTyrRS* спочатку було конвертовано з pdb формату у внутрішній формат GROMACS - gro. В розрахунках молекулярної динаміки використовували силове поле AMBER99SB-ILDN [16]. Структура білка розміщували в боксі, який має форму октаедра з мінімальною відстанню від стінок боксу до атомів білка 10 Å. Далі бокс було заповнено водою моделі SPC216, та нейтралізовано систему шляхом додавання іонів Na⁺ і Cl⁻ при концентрації 150 мМ. Після цього було виконано мінімізацію енергії системи у два підходи, спершу методом крутого спуску і потім методом спряженого градієнта. Далі у два підходи розраховувалась МД із позиційною прив'язкою атомів білка до їхніх вихідних координат. Результиуюча система вводилась як вхідна в розрахунок МД. Інтегрування здійснювалося кроками по 2фс. Координати атомів записувалися у файл траєкторії з періодичністю 2 пс. Електростатичні взаємодії враховувалися за методом PME, для ван-дер-вальсових взаємодій використовувалося подвійне усічення: на відстані 1,2 нм взаємодії враховувалися на кожному кроці. Температура і тиск системи підтримувалися постійними при 310 К (37°C) та 1бар, відповідно.

Конвертація траєкторій та їх нарізання на окремі фрейми виконувались за допомогою програми trjconv. Середньоквадратичні відхилення та флуктуації атомів від їхніх вихідних позицій розраховували за допомогою програм g_rms та g_rmsf, відповідно. Для побудови графіків по отриманих координатах було використано графічну програму Grace-5.1.22. Для візуалізації окремих фреймів фреймів використовували програму PyMOL-1.3 [17].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На графіку зміни середньоквадратичних відхилень (СКВ) С-альфа атомів від їхніх вихідних позицій в ході моделювання МД (рис 1.) видно, що отриману траєкторію конформаційних рухів *MtTyrRS* можна умовно поділити на дві стадії: релаксацію структури білка та власне динаміку білка після 20-ї нс.

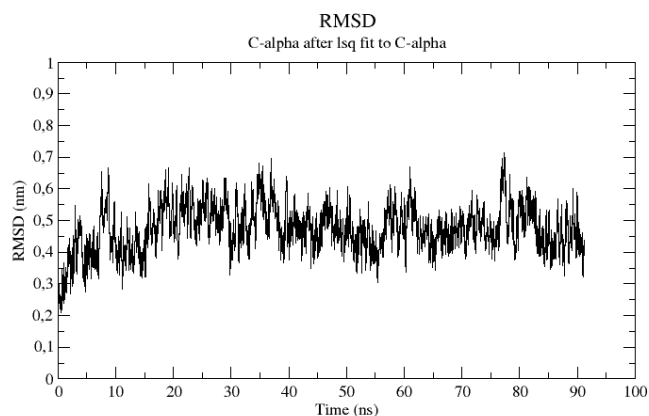


Рис. 1. Графік зміни середньоквадратичних відхилень С-альфа атомів від їхніх вихідних позицій в ході симуляції МД

На першому етапі СКВ зростають з часом і до 20-ї нс фермент набуває більш стабільного стану. На другому етапі СКВ коливаються в межах від 0,3 до 0,7 ангстрем. Така амплітуда СКВ зумовлена кількома чинниками. По-перше, димер *MtTyrRS* складається з 848 амінокислотних залишків, і тому такі СКВ припустимі для білка таких розмірів. По-друге, це зумовлено високою рухливістю С-модулів відносно каталітичних N-модулів в процесі МД.

Графік зміни середньоквадратичних флуктуацій (СКФ) С-альфа атомів від їхніх вихідних позицій в ході моделювання МД показує (рис 2.), що найбільш рухливими елементами білка є С-модулі завдяки конформаційній гнучкості міжмодульного лінкера, а також висококонсервативні неструктуровані каталітичні петлі синтетази, які містять KMSKS-подібний каталітичний мотив в *MtTyrRS* – KFGKS.

СКФ найбільш рухливих амінокислотних залишків каталітичних петель досягають 0,39 нм для Gly237 в субодиноці А та 0,47 нм для Gly237 в субодиноці В *MtTyrRS* (рис. 3).

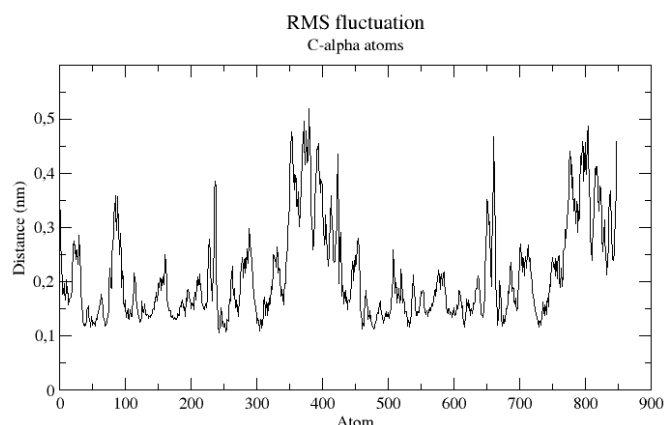


Рис. 2. Графік середньоквадратичних відхилень С-альфа атомів від їхніх вихідних позицій на другому етапі МД

Така висока рухливість цих амінокислотних залишків може бути пояснена природною неструктурованістю каталітичних петель в активному центрі фермента. Проте нами виявлено, що в процесі МД петля KFGKS здатна формувати у своїй структурі два антипаралельні динамічні β -стренди.

СКФ С-модулів *MtTyrRS* досягають 0,52 нм в субодиноці А та 0,49 нм в субодиноці В. Важливо відзначити, що конформаційні рухи С-модулів можна описати як почергове віддалення та наближення до каталітичних N-модулів (рис. 4).

Така поведінка білка дає підстави зробити висновок, що конформаційна рухливість окремих субодиноць в *MtTyrRS* добре корелює між собою в складі димера, і вірогідно така кореляція відбувається шляхом передачі конформаційних сигналів через інтерфейс субодиноць. Описані вище відхилення С-модулів в *MtTyrRS* відбуваються почергово для кожної субодиноць протягом всієї симуляції МД. На рис. 4 видно, що корельовано флуктуюючі С-модулі димера *MtTyrRS* приводять до формування антисиметричної конформації димера *MtTyrRS*.

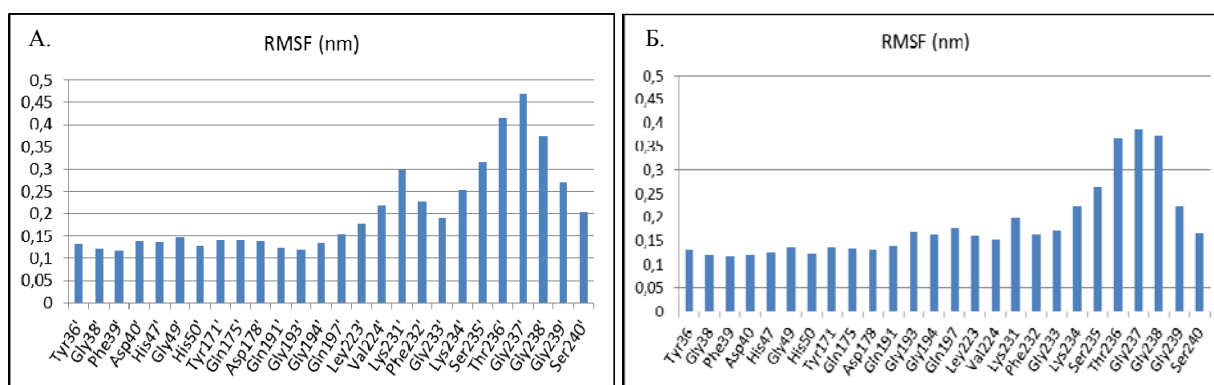


Рис. 3. Графік середньоквадратичних відхилень С-альфа атомів від їхніх вихідних позицій амінокислотних залишків активного центру субодиноць А (А) та субодиноць В (Б)

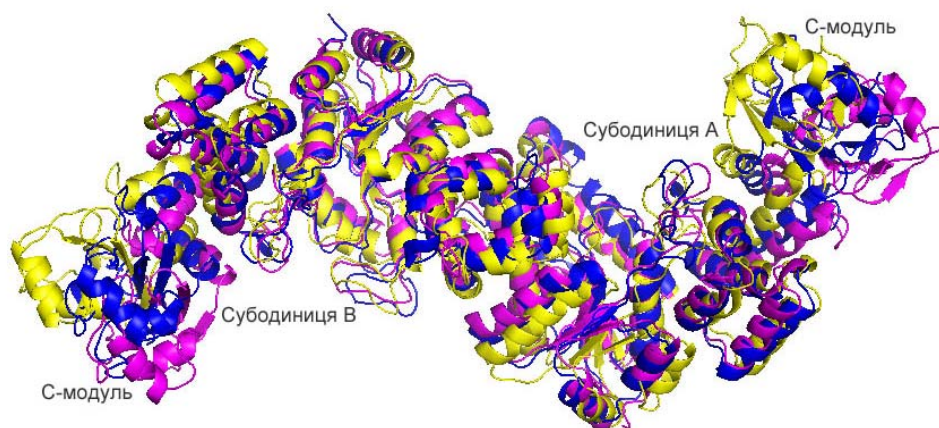


Рис. 4. Третинна структура димера *MtTyrRS*: до моделювання МД (голубий колір); з витягнутим С-модулем субодина A, (малиновий колір); з витягнутим С-модулем субодина B, (жовтий колір)

Відомо, що в бактеріальних тирозил-тРНК синтетазах при каталізі реакції аміноацилювання активні центри фермента, розміщені на кожній субодинаці, працюють по чергову [18-19]. Можливо, це є наслідком формування антисиметричної конформації димера *MtTyrRS*, виявленої нами в процесі молекулярної динаміки фермента.

На графіку зміни загальної площі поверхні димера *MtTyrRS* в процесі моделювання МД (рис. 5) видно, що існує тенденція до її зменшення, а отже до компактизації структури білка.

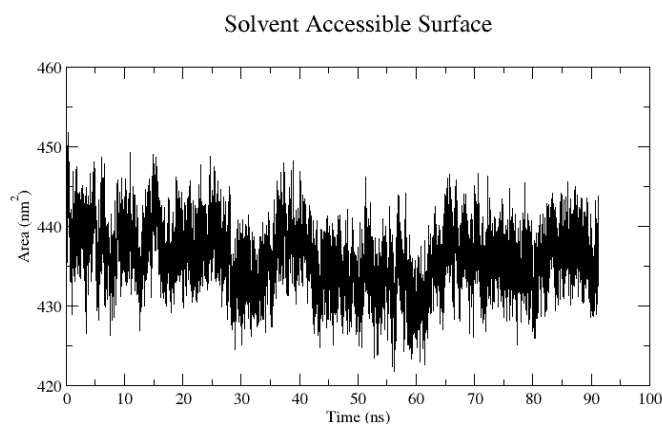


Рис. 5. Графік зміни загальної площі поверхні димера *MtTyrRS* в ході симуляції МД

Проте цей процес має флуктуативну природу, і на певних етапах динаміки площа поверхні білка знову збільшується. Цей ефект можна пояснити вище згаданою конформаційною рухливістю С-модулів відносно каталітичних N-модулів в процесі МД.

ВИСНОВКИ

Застосування комп'ютерних ґрид-технологій дозволило вперше провести розрахунки МД ключового фермента метаболізму туберкульозної палички *MtTyrRS* в розчині в часовому інтервалі 90 нс. Отримані результати вказують на антисиметричну конформаційну рухливість С-модулів відносно

каталітичних N-модулів синтетази завдяки конформаційній гнучкості неструктурованого міжмодульного лінкера. Виявлена висока конформаційна рухливість амінокислотних залишків в неструктурованій каталітичній петлі активного центра фермента та динамічне формування двох антипаралельних β -стрендів в процесі МД.

ПОДЯКА

Робота підтримана грантом №15/2011 Державної цільової науково-технічної програми впровадження і застосування ґрид-технологій на 2009 – 2013 роки.

Література

1. Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis // *Nature*. – 2011. – Vol. 469. – P. 483-490.
2. Hoffmann M, Torchala M. Search for inhibitors of aminoacyl-tRNA synthetases by virtual click chemistry // *J Mol Model*. – 2009. – Vol. 15, No. 6. – P. 665-72.
3. Finn J, Stidham M, Hilgers M, G C K. Identification of novel inhibitors of methionyl-tRNA synthetase (MetRS) by virtual screening // *Bioorg Med Chem Lett*. – 2008. – Vol. 18, No. 14. – P. 3932-3937.
4. Eitner K, Gaweda T, Hoffmann M, Jura M, Rychlewski L, Barciszewski J. eHiTS-to-VMD interface application. The search for tyrosine-tRNA ligase inhibitors // *J Chem Inf Model*. – 2007. – Vol. 47, No 2. – P. 695-702.
5. Bedouelle H. Tyrosyl-tRNA Synthetases. // *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience. – 2000.
6. Yaremchuk A, Kriklyviy I, Tukalo M, Cusack S. Class I tyrosyl-tRNA synthetase has a class II mode of cognate tRNA recognition // *EMBO J*. – 2002. – Vol. 21, No 14. – P. 3829-3840.
7. Одинець К. О., Корнелюк О. І. Модель просторової структури тирозил-тРНК синтетази збудника туберкульозу *Mycobacterium tuberculosis* // *Укр.біохім.журн*. – 2008. – № 5. – С. 36-49.
8. Li T., Froeyen M, Herdewijn P. Comparative structural dynamics of Tyrosyl-tRNA synthetase complexed with different substrates explored by molecular dynamics // *Eur Biophys J*. – 2008. – Vol. 38, No 1. – P. 25-35.

9. Salnikov A.O., Sliusar I.A., Sudakov O.O., Savytskyi O.V., Kornelyuk A.I. Virtual laboratory moldyngrid as a part of scientific infrastructure for biomolecular simulations // International Journal of Computing. – 2010. – Vol. 9, No 4. – P. 294-300.
10. Сальников А.О., Судаков О.О., Савицький О.В., Слюсар Є.А., Корнелюк О.І. Інтегроване середовище віртуальної лабораторії MolDynGrid для розрахунків молекулярної динаміки біополімерів // Медична інформатика та інженерія – 2010. – Т. 3. – № 1. – С. 24-32.
11. Fiser A, Do RK, Sali A. Modeling of loops in protein structures // Protein Sci. – 2000. – V. 9 – P. 1753-1773.
12. Fiser A, Sali A. ModLoop: automated modeling of loops in protein structures // Bioinformatics. – 2003. – Vol. 19. – P. 2500-2501.
13. Vincent B. Chen, W. Bryan Arendall III, Jeffrey J. Headd, Daniel A. Keedy, Robert M. Immormino, Gary J. Kapral, Laura W. Murray, Jane S. Richardson and David C. Richardson. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography // Acta Crystallographica. Biological Crystallography. – 2010. – Vol. 66. – P. 12-21.
14. Krieger E., Joo K., Lee J., Lee J., Raman S., Thompson J., Tyka M., Baker D., Karplus K. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8 // Proteins – 2009. – Vol. 77. – P. 114-122.
15. Hess B., Kutzner C., Van Der Spoel D., et al. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation // J. Chem. Theory Comput. – 2008. - Vol. 4. - P. 435-447.
16. Hornak et. al Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters // Proteins. – 2006. - Vol. 65. - P. 712-725.
17. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC.
18. Ward WH, Fersht AR. Asymmetry of tyrosyl-tRNA synthetase in solution. Biochemistry. 1988;27(3):1041–1049.
19. Ward WH, Fersht AR. Tyrosyl-tRNA synthetase acts as an asymmetric dimer in charging tRNA. A rationale for half-of-the-sites activity. Biochemistry. 1988;27(15):5525–5530.

КОНФОРМАЦИОННАЯ ПОДВИЖНОСТЬ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ ЭУБАКТЕРИИ *M. tuberculosis* ПО ДАННЫМ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Микуляк В.В., Корнелюк А.І.

Тирозил-тРНК синтетаза эубактерии *M.tuberculosis* (MtTyrRS) является ферментом, который катализирует присоединение тирозина к гомологической тРНК на дорибосомном этапе синтеза белка. Ингибирование MtTyrRS может существенно ингибировать рост патогенных бактерий, поэтому [MtTyrRS](#) является перспективной мишенью для разработки новых противотуберкулезных препаратов, поскольку не способна к перекрестному распознаванию и аминоацилированию цитоплазматической тРНК^{Tyr} человека. В работе проведено моделирование молекулярной динамики (МД) димера MtTyrRS в растворе при условиях, приближенных к физиологическим, во временном интервале 90 нс с использованием компьютерных грид-технологий и сервисов виртуальной лаборатории MolDynGrid. Получены данные о высокой антисимметричной конформационной подвижности С-модулей относительно каталитических N-модулей синтетазы благодаря конформационной гибкости неструктурированных межмодульных линкеров. Обнаружена также высокая конформационная подвижность аминокислотных остатков в неструктурированной каталитической петле активного центра фермента, причем в процессе МД каталитическая петля способна формировать два антипараллельные динамические β-стрэнды.

Ключевые слова: тирозил-тРНК синтетаза *Mycobacterium tuberculosis*, молекулярная динамика, GROMACS, грид-технологии.

CONFORMATIONAL MOBILITY OF TYROSYL-tRNA SYNTHETASE FROM *M. tuberculosis* EUBACTERIA ACCORDING TO COMPUTER MODELING OF MOLECULAR DYNAMICS DATA

Mykuliak V.V., Kornelyuk A.I.

Tyrosyl-tRNA synthetase from *M. tuberculosis* eubacteria (MtTyrRS) is an enzyme that catalyzes the attachment of tyrosine to cognate tRNA at pre-ribosomal step of protein biosynthesis. Inhibition of [MtTyrRS](#) can significantly inhibit the growth of pathogenic bacteria, so MtTyrRS is promising target for developing of new antituberculosis drugs, since this bacterial enzyme is not able to cross-recognition and aminoacylation of human cytoplasmic tRNA^{Tyr}. In this paper the molecular dynamics simulation (MD) of the MtTyrRS dimer in solution was performed at conditions close to physiological ones, at the 90 ns time interval using computational grid technologies and services of MolDynGrid virtual lab. The high conformational mobility of the antisymmetric C-modules in relation to the catalytic N-modules of MtTyrRS was observed due to the conformational flexibility of unstructured intermodule linker. A high conformational flexibility of amino acid residues at the unstructured catalytic loop of enzyme active site was observed for MtTyrRS. Moreover, the catalytic loop is able to form two antiparallel dynamic β-strands in the course of MD simulation.

Key words: tyrosyl-tRNA synthetase, *Mycobacterium tuberculosis*, molecular dynamics, GROMACS, grid technologies.