

В. В. Микуляк, член-кореспондент НАН України О. І. Корнелюк

Динамічне формування β -тяжової структури в активному центрі тирозил-тРНК синтетази еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* за даними молекулярної динаміки

Тирозил-тРНК синтетаза еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* (*MtTyrRS*) є перспективною мішенню для розробки селективних інгібіторів, які можуть стати новими лікарськими препаратами проти туберкульозу. З метою вивчення конформаційної рухливості активного центру *MtTyrRS* проведено моделювання молекулярної динаміки (МД) димеру ферменту в часовому інтервалі 45 нс. Встановлено, що в процесі динаміки в неструктурованій каталітичній петлі *MtTyrRS* відбувається динамічне формування двох антипаралельних β -тяжів, перший з яких містить амінокислотні залишки Lys234 і Ser235 універсального каталітичного KMSKS-подібного мотиву АРСаз I класу (KFGKS у *MtTyrRS*). Стабілізована конформація каталітичної петлі *MtTyrRS* може відіграти важливу роль у зв'язуванні субстратів з активним центром та наступній стабілізації перехідного стану реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr}. Цей висновок підтверджується наявністю подібної β -шпильки в кристалографічній структурі комплексу гомологічної TyrRS *Escherichia coli* з аналогом тирозиладенілату — проміжного продукту реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr}.

Патогенна еубактерія *Mycobacterium tuberculosis* спричиняє розвиток туберкульозу у людини, який сьогодні є однією з найпоширеніших хвороб в історії людства [1]. З появою нових мультирезистентних штамів *M. tuberculosis* істотно ускладнюється проблема лікування туберкульозу і постає необхідність створення нових ефективних протитуберкульозних препаратів [1]. В останні роки пошук ефективних антибактеріальних препаратів проводиться для широкого спектра нових потенційних білків-мішеней, зокрема для аміноацил-тРНК синтетаз (АРСаз) — ключових ферментів біосинтезу білка [2, 3]. Тирозил-тРНК синтетаза є ферментом I класу АРСаз, який каталізує приєднання тирозину до гомологічної тРНК на дорибосомному етапі синтезу білка [4]. Ця реакція є АТФ-залежною і проходить у два етапи: на першому етапі утворюється проміжний продукт реакції тирозиладенілат, а на другому етапі відбувається ковалентне приєднання тирозину до тРНК^{Tyr} і утворення тирозил-тРНК^{Tyr}.

Кристалографічна структура *MtTyrRS* у вільному стані депонована в Protein Data Bank у 2008 р. (PDB код 2JAN). *MtTyrRS* потенційно є перспективним білком-мішенню для пошуку і розробки її ефективних і нетоксичних інгібіторів — прототипів нових 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. По-друге, структура *MtTyrRS* значно відрізняється від цитоплазматичної TyrRS людини, яка має інший (еукаріотичний) тип просторової структури і значні відмінності в будові активного центру [4, 5]. Гомологія амінокислотних послідовностей цих двох TyrRS становить менше 20% і не детектується комп'ютерним попарним зіставленням

“Blast 2 Sequences”. По-третє, TyrRS прокариотичного і еукаріотичного типів не здатні до перехресного розпізнавання та аміноацилювання відповідних тРНК^{Tyr} [4, 5].

Нами проведено комп'ютерне моделювання динаміки активного центру *MtTyrRS*, зокрема каталітичної петлі KMSKS, універсальної для APCаз I класу. Неструктурована каталітична петля KMSKS є високорухливим елементом білка [6], проте в присутності субстратів реакції аміноацилювання АТФ та тирозину набуває більш упорядкованого стану [7].

Для розрахунку молекулярної динаміки (МД) у довгих часових проміжках використовувались ресурси Українського національного ґрідзу [8]. Постановка задачі, її обрахунків та отримання даних проведені з використанням сервісів віртуальної лабораторії MolDynGrid (<http://moldyngrid.org>) [9, 10].

Просторову структуру *MtTyrRS* визначено методом рентгеноструктурного аналізу з роздільною здатністю 2,9 Å, проте при цьому деякі елементи структури не виявлені. Для добудови відсутніх амінокислотних залишків у структурі петель субодиниці А: Met1-Met4 і Gly424, та в субодиниці В: Met1-Met4 і Pro81-Asp93, використовували спеціалізований веб-сервер ModLoop [11]. Оцінку якості структури з метою перевірки правильності кутів між атомами та відсутності клешів (накладань атомів один на один) у добудованій структурі *MtTyrRS* здійснювали за допомогою веб-сервера MolProbity [12]. З метою оптимізації отриманої структури проводили мінімізацію енергії білка за допомогою веб-сервера YASARA Energy Minimization Server [13]. Після мінімізації енергії повторно оцінювали якість отриманої структури.

Розрахунки молекулярної динаміки *MtTyrRS* виконували за допомогою версії пакета програм GROMACS 4.5.3 [14]. Координати структури *MtTyrRS* були конвертовані з pdb формату у внутрішній формат GROMACS — gro. У розрахунках використовувалось силове поле AMBER99SB-ILDN. Структуру білка розміщували в боксі, який має форму октаедра, з мінімальною відстанню від стінок боксу до атомів білка 10 Å. Бокс заповнювали водою моделі SPC216 та систему нейтралізували шляхом додавання іонів Na⁺ і Cl⁻ концентрацією 150 mM. Після цього проводили мінімізацію енергії системи у два підходи: перший — методом крутого спуску, другий — методом спряженого градієнта. Далі в два підходи розраховували МД із позиційною прив'язкою атомів білка до їхніх вихідних координат. Результуюча система вводилась як вхідна в розрахунок МД. Інтегрування здійснювали кроками по 2fs. Координати атомів записувалися у файл траєкторії з періодичністю 2 пс. Електростатичні взаємодії враховувалися за методом PME, для ван-дер-ваальсових взаємодій використовувалося подвійне усічення: на відстані 1,2 нм взаємодії враховувалися на кожному кроці. Температуру і тиск системи підтримували постійними: 310 K (37 °C) та 1 бар відповідно.

Конвертацію траєкторій та нарізання їх на фрейми виконували за допомогою програми *trjconv*. Середньоквадратичні відхилення та флуктуації атомів від їхніх вихідних позицій розраховували за допомогою програм *g_rms* та *g_rmsf* відповідно. За допомогою програми *do_dssp* було побудовано матриці залежності зміни вторинної структури від часу у форматі *xrm*. Для конвертації файла *xrm* у графічний файл використовували програму *xrm2ps*. Побудову графіків по отриманих координатах здійснювали за допомогою графічної програми *Gnuplot-5.1.22*. Для візуалізації окремих фреймів застосовували програму *RuMOL-1.3*.

Виходячи з графіка зміни середньоквадратичних відхилень C_α атомів від їхніх вихідних позицій у ході моделювання МД (рис. 1, а) можна зробити висновок, що отриману траєкторію конформаційних рухів димеру *MtTyrRS* умовно можна поділити на дві стадії: релаксацію структури білка (до 20 нс) та власне динаміку білка після 20 нс. На графі-

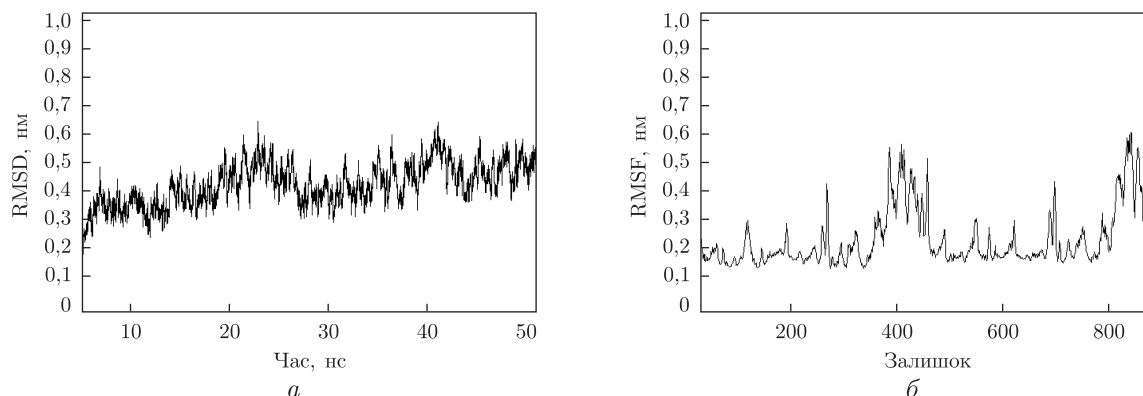


Рис. 1. Графік середньоквадратичних відхилень (а) та середньоквадратичних флуктуацій (б) C_{α} атомів від їхніх вихідних позицій у ході молекулярної динаміки білка

ку зміни середньоквадратичних флуктуацій C_{α} атомів від їхніх вихідних позицій у ході моделювання МД (див. рис 1, б) видно, що найбільш рухливими елементами ферменту є висококонсервативні каталітичні петлі KMSKS та С-кінцеві домени.

Встановлено, що в процесі динаміки в неструктурованих каталітичних петлях *MtTyrRS* відбувається динамічне формування двох антипаралельних β -тяжів (рис. 2), перший з яких містить амінокислотні залишки Lys234 та Ser235 універсального каталітичного KMSKS-по-

Таблиця 1. Часові інтервали формування двох антипаралельних β -тяжів у субодинацях протягом моделювання молекулярної динаміки, за визначенням програми do_dssp пакета програм GROMACS

№ п/п	Динамічне формування β -стрендів, нс		Тривалість, нс
Субодинаця А			
1	1,55	3,80	2,25
2	4,40	4,56	0,16
3	4,85	5,28	0,43
4	6,88	7,07	0,19
5	19,27	19,32	0,05
6	20,09	20,18	0,90
7	33,15	35,13	1,98
8	36,85	37,26	0,41
9	37,57	38,15	0,58
10	38,21	38,30	0,09
11	38,40	38,95	0,55
12	39,56	41,05	1,49
13	42,58	43,16	0,58
14	44,15	44,67	0,52
Субодинаця Б			
1	29,90	30,22	0,32
2	30,85	30,92	0,07
3	31,04	31,11	0,07
4	42,20	42,28	0,08
5	45,85	46,08	0,23

Примітка. Наведено всі інтервали, тривалість яких становить більше 10 пс, оскільки утворення цих β -стрендів у межах 10 пс відбувається майже кожної наносекунди. Також у вказаних проміжках формування β -шпильок існують розриви (інтервали тривалістю до 10 пс, де стабільні β -стренди не зафіксовано).

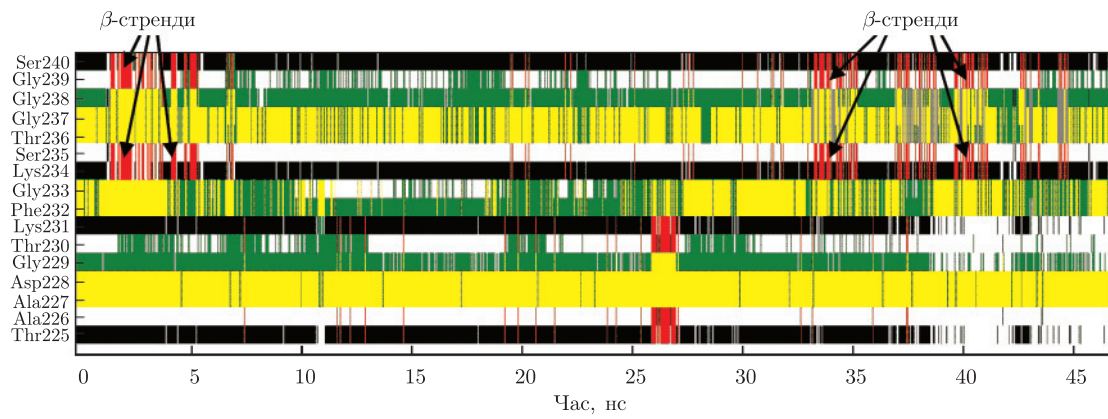


Рис. 2. Зміни вторинної структури каталітичної петлі Thr225–Ser240 субодиниці А *MtTyrRS* в процесі молекулярної динаміки

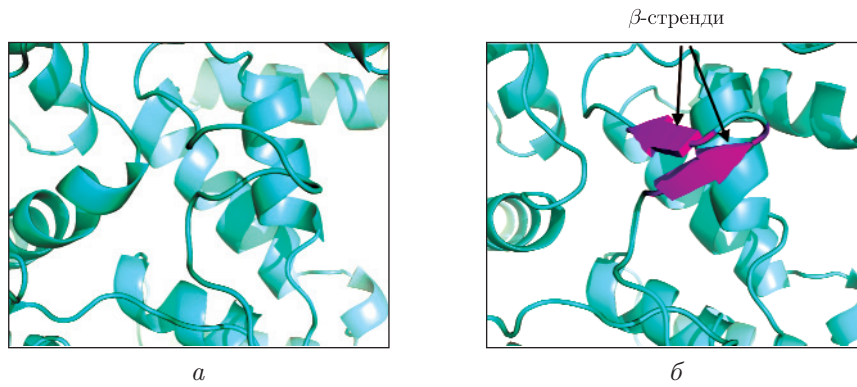


Рис. 3. Вторинна структура активного центру *MtTyrRS* до динаміки (а) і формування динамічних антипаралельних β -тяжів в активному центрі на 40-й нс молекулярної динаміки (б)

дібного мотиву APCаз I класу (KFGKS (Lys231, Phe232, Gly233, Lys234, Ser235) у *MtTyrRS*). Динамічні β -тяжі складаються з амінокислотних залишків Lys234, що входить до складу активного центру, Ser235 та Thr236 (перший β -тяж), Gly238, Gly239 та Ser240 (другий β -тяж). Утворена β -шпилька в активному центрі *MtTyrRS* (рис. 3, б) не є регулярним елементом вторинної структури білка, а динамічно утворюється по чергово в кожній із субодиниць ферменту внаслідок активних флуктуацій конформації каталітичної петлі. Тривалість стабільності даних β -стрендів коливається від десятків пікосекунд до кількох наносекунд (табл. 1).

Стабілізована конформація каталітичної петлі *MtTyrRS* може відіграти важливу роль у зв'язуванні субстратів з активним центром та наступній стабілізації перехідного стану реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr}. Зазначимо, що подібна β -шпилька виявлена в кристалографічній структурі комплексу *TyrRS Escherichia coli* з аналогом тирозиладенілату — проміжного продукту реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr} [15].

Отже, в процесі молекулярної динаміки *MtTyrRS* у розчині в часовому інтервалі 45 нс виявлено динамічне формування β -шпильки в активному центрі ферменту, що може відіграти важливу роль у зв'язуванні субстратів та стабілізації перехідного стану реакції аміноацилювання тРНК^{Tyr}.

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

1. Koul A., Arnoult E., Lounis N. et al. The challenge of new drug discovery for tuberculosis // Nature. – 2011. – **469**. – P. 483–490.
2. Hoffmann M., Torchala M. Search for inhibitors of aminoacyl-tRNA synthetases by virtual click chemistry // J. Mol. Model. – 2009. – **15**, No 6. – P. 665–672.
3. Eitner K., Gaweda T., Hoffmann M. et al. eHiTS-to-VMD interface application. The search for tyrosine-tRNA ligase inhibitors // J. Chem. Inf. Model. – 2007. – **47**, No 2. – P. 695–702.
4. Bedouelle H. Recognition of tRNA(Tyr) by tyrosyl-tRNA synthetase // Biochimie. – 1990. – **72**, No 8. – P. 589–598.
5. Одинець К. О., Корнелюк О. І. Модель просторової структури тирозил-тРНК синтетази збудника туберкульозу *Mycobacterium tuberculosis* // Укр. біохім. журн. – 2008. – № 5. – С. 36–49.
6. 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. – **38**, No 1. – P. 25–35.
7. Yaremchuk A., Kriklyvi I., Tukalo M., Cusack S. Class I tyrosyl-tRNA synthetase has a class II mode of cognate tRNA recognition // EMBO J. – 2002. – **21**, No 14. – P. 3829–3840.
8. Загородній А. Г., Зінов'єв Г. М., Мартинов Є. С. та ін. Грид – нова інформаційно-обчислювальна технологія для науки // Вісн. НАН України. – 2005. – № 6. – С. 17–25.
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 // Int. J. Comput. – 2010. – **9**, No 4. – P. 294–300.
10. Сальников А. О., Судаков О. О., Савицький О. В., Смосар Є. А., Корнелюк О. І. Інтегроване середовище віртуальної лабораторії MolDunGrid для розрахунків молекулярної динаміки біополімерів // Мед. інформатика та інженерія – 2010. – **3**, № 1. – С. 24–32.
11. Fiser A., Sali A. ModLoop: automated modeling of loops in protein structures // Bioinformatics. – 2003. – **19**. – P. 2500–2501.
12. Chen V. B., Arendall W. B. III, Headd J. J. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography // Acta Crystallogr. Biol. Crystallogr. – 2010. – **66**. – P. 12–21.
13. Krieger E., Joo K., Lee J. et al. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8 // Proteins. – 2009. – **77**. – P. 114–122.
14. 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. – **4**. – P. 435–447.

15. Kobayashi T., Takimura T., Sekine R. et al. Structural snapshots of the KMSKS loop rearrangement for amino acid activation by bacterial tyrosyl-tRNA synthetase // J. Mol. Biol. – 2005. – **346**. – P. 105–117.

Інститут високіх технологій Київського
національного університету ім. Тараса Шевченка, Київ
Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 26.07.2011

В. В. Микуляк, член-кореспондент НАН України **А. І. Корнелюк**

Динамическое формирование β -тяжевой структуры в активном центре тирозил-тРНК синтетазы эубактерии *Mycobacterium tuberculosis* по данным молекулярной динамики

*Тирозил-тРНК синтетаза эубактерии *M. tuberculosis* (MtTyrRS) является перспективной мишенью для разработки селективных ингибиторов, которые могут стать новыми лекарственными препаратами против туберкулеза. С целью изучения конформационной подвижности активного центра MtTyrRS проведено моделирование молекулярной динамики (МД) димера фермента во временном интервале 45 нс. Установлено, что в процессе динамики в неструктурированной каталитической петле MtTyrRS происходит динамическое формирование двух антипараллельных β -тяжей, первый из которых содержит аминокислотные остатки Lys234 и Ser235 универсального каталитического KMSKS-подобного мотива APCаз I класса (KFGKS в MtTyrRS). Стабилизирована конформация каталитической петли MtTyrRS может играть важную роль в связывании субстратов с активным центром и последующей стабилизации переходного состояния реакции аминоацилирования тРНК^{Tyr}. Этот вывод подтверждается наличием подобной β -шпильки в кристаллографической структуре комплекса гомологичной TyrRS *Escherichia coli* с аналогом тирозиладенилата – промежуточного продукта реакции аминоацилирования тРНК^{Tyr}.*

V. V. Mykuliak, Corresponding Member of the NAS of Ukraine **A. I. Kornelyuk**

Dynamic formation of the β -strand structure in the active site of tyrosyl-tRNA synthetase from *Mycobacterium tuberculosis* eubacteria according to the molecular dynamics

*Tyrosyl-tRNA synthetase from *M. tuberculosis* (MtTyrRS) is a promising target for the development of novel selective inhibitors as new antituberculosis drugs. In order to study the conformational mobility of the MtTyrRS active center, we performed molecular dynamics (MD) simulation of a dimer of the enzyme in a time interval of 45 ns. It is found that two antiparallel β -strands are formed in the unstructured catalytic KMSKS loop in the course of dynamics. The first of them contains Lys234 and Ser235 amino acid residuals of universal catalytic KMSKS (KFGKS for MtTyrRS) motif of aaRS of class I. The stabilized conformation of the MtTyrRS catalytic loop can play an important role in the binding of substrates with active center and in the subsequent stabilization of the intermediate stage of the tRNA^{Tyr} aminoacylation reaction. This conclusion is supported by existing the similar β -strand in the crystallographic structure of the complex of homologous TyrRS *Escherichia coli* with an analog of tyrosyl-adenylate (intermediate product of tRNA^{Tyr} aminoacylation reaction).*