

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

МИКУЛЯК Василь Васильович

УДК 577.32:577.152.6+544.475

**МОЛЕКУЛЯРНА ДИНАМІКА ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ
ЕУБАКТЕРІЇ *Mycobacterium tuberculosis* ТА ФОРМУВАННЯ
МЕТАСТАБІЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ В АКТИВНОМУ ЦЕНТРІ**

03.00.02 – біофізика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України та у відділі білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України,
Корнелюк Олександр Іванович
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
завідувач відділу білкової інженерії та біоінформатики

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
Білан Павло Володимирович
Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України,
завідувач лабораторії молекулярної біофізики;

доктор фізико-математичних наук, старший науковий
співробітник,

Шестопалова Ганна Вікторівна
Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова
НАН України, завідувач відділу біологічної фізики.

Захист відбудеться “01” червня 2016 року о “14⁰⁰” годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, просп. Академіка Глушкова, 2, ННЦ “Інститут біології”, ауд. 434.

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ “Інститут біології”, спеціалізована вчена рада Д 26.001.38.

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці імені М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58.

Автореферат розіслано “27” квітня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38,
доктор біологічних наук



Т. М. Фалалєєва

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. У зв'язку з появою нових резистентних штамів еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* існує потреба в розробці нових антибактерійних інгібіторів [Singh et al., 2015; Disratthakit et al., 2015]. Аміноацил-тРНК синтетази розглядають як перспективні мішені для розробки нових антибактерійних інгібіторів [Zhao et al., 2014; Lv et al., 2012]. Тирозил-тРНК синтетаза еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* (*MtTyrRS*) є ключовим ферментом, що здійснює перший крок синтезу білка на дорибосомному етапі. *MtTyrRS* відноситься до I-го структурного класу аміноацил-тРНК синтетаз, і містить у своїй структурі характерні для цього класу каталітичні послідовності HAGH і KFGKS, та каталізує високоспецифічне приєднання L-тироzinу до гомологічної йому тРНК [Bonfond et al., 2005]. Реакція є АТФ-залежною і відбувається у два етапи. На першому етапі з ферментом зв'язується L-тирозин та АТФ і утворюється проміжний продукт реакції естерифікації тирозил-аденілат та вивільнюється пірофосфат. На другому етапі з *MtTyrRS* зв'язується гомологічна тРНК^{Tyr} та відбувається ковалентне приєднання до неї L-тироzinу, після чого від ферменту дисоціює навантажена амінокислотою тирозил-тРНК^{Tyr} та АМФ [Banik and Nandi, 2012; Dutta et al., 2014].

Інгібування ферментативної активності *MtTyrRS* є потенційним шляхом пошуку і розробки нових антибактерійних інгібіторів. Це обумовлено тим, що *TyrRS* належить до найбільш життєво-важливих білків клітини, і її інгібування повинно суттєво пригнічувати ріст патогенних бактерій. Структура *MtTyrRS* значно відрізняється від цитоплазматичної *TyrRS* людини, яка має інший (евкаріотний) тип просторової структури і значні відмінності у будові активного центру. Гомологія амінокислотних послідовностей цих двох *TyrRS* із різних організмів менша 20% [Одинець та Корнелюк, 2008]. Важливо відмітити, що *TyrRS* прокариотного і еукаріотного типів не здатні до перехресного розпізнавання та аміноацилювання відповідних тРНК^{Tyr} [Wakasugi et al., 1998].

Структури тирозил-тРНК синтетаз деяких бактерій досліджували протягом останніх років методом рентгеноструктурного аналізу. Однак цей метод дає інформацію тільки про статичну структуру, а не конформаційну динаміку ферменту. Внесок динаміки білка в його функціонування залишається мало вивченим, незважаючи на численні кристалографічні структури тирозил-тРНК синтетаз у вільному стані та в комплексах з різними субстратами. Більше того, більшість інформації про динаміку *TyrRS*, особливо каталітичної петлі, базується на порівнянні кристалографічних структур ферментів різних організмів або рідше одного організму. Питання, які стосуються динаміки активного центру *MtTyrRS*, нині залишаються без відповідей. Недостатньо даних існує про динаміку активного центру *TyrRS* бактерій, зокрема каталітичної петлі, зв'язування субстратів та загальної динаміки димерного ферменту. Вивчення динаміки білка є необхідною складовою процесу дослідження каталітичного механізму ферменту та розробки підходів до

інгібування ферменту. Наприклад, вивчення конформаційної рухливості білка мало вирішальне значення для розробки інгібіторів тимідилат синтетази [Fritz et al., 2001], прегнан-Х-рецептора [Watkins et al., 2001] та інших білків. Сучасний метод комп'ютерного моделювання молекулярної динаміки дозволяє досліджувати динаміку білків на наносекундних і мікросекундних часових інтервалах.

Вивчення динаміки тирозил-тРНК синтетази еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* є важливим як для глибокого розуміння молекулярного механізму функціонування ферменту, так і для створення нових інгібіторів ферменту.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано на кафедрі молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України за темою: “Фізико-хімічні механізми функціонування живого на різних рівнях організації” (2011-2015 рр., державний реєстраційний номер 0111 U007663) та у відділі білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України відповідно з планами науково-дослідної роботи відділу в рамках бюджетної теми “Дослідження локальних конформаційних змін та формування метастабільних структурних елементів в тирозил-тРНК синтетазах прокариотів та еукаріотів” (2013-2017 рр., державний реєстраційний номер 0107 U004938).

Мета і задачі дослідження. Мета роботи – провести моделювання молекулярної динаміки тирозил-тРНК синтетази еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* у водно-іонному розчині та аналіз динаміки активного центру ферменту, а також провести дизайн нових інгібіторів цього ферменту.

Відповідно до мети було поставлено такі задачі:

1. дослідити структурну динаміку димеру *MtTyrRS* у вільному стані у водно-іонному розчині;
2. провести комп'ютерне моделювання структур комплексів *MtTyrRS* з субстратами L-тирозином і АТФ та проміжним продуктом реакції тирозил-аденілатом;
3. провести моделювання молекулярної динаміки комплексів тирозил-тРНК синтетази з субстратами та тирозил-аденілатом;
4. охарактеризувати динаміку активного центру ферменту та каталітичної KFGKS-петлі зокрема;
5. провести дизайн нових специфічних інгібіторів *MtTyrRS* з врахуванням динаміки активного центру ферменту.

Об'єкт дослідження – молекулярні основи конформаційної рухливості білків та білково-лігандних комплексів.

Предмет дослідження – структурна динаміка *MtTyrRS*, зокрема її активного центру та каталітичної KFGKS-петлі, і механізми взаємодії субстратів з активним центром.

Методи дослідження – метод комп'ютерного моделювання просторової структури та оптимізації структури білків; метод молекулярної динаміки; метод раціонального дизайну інгібіторів.

Наукова новизна одержаних результатів. Отримані в дисертації дані розширюють уявлення щодо функціонування *Mycobacterium tuberculosis* TyrRS у розчині та структурно-функціонального стану каталітичної KMSKS-петлі APCаз I-го класу, які можуть бути використані для розробки нових інгібіторів TyrRS бактерій.

Вперше показано динамічне формування антипаралельних β -стрендів у неструктурованій каталітичній KMSKS-подібній петлі тирозил-тРНК синтетази еубактерії *Mycobacterium tuberculosis*, яка характерна для APCаз I-го класу. Досліджено динаміку формування цих структур у часі та їхню функцію, що полягає у підтриманні структури каталітичної петлі у функціональному стані.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані в дисертації дані розширюють уявлення щодо функціонування димеру *MtTyrRS* у водно-іонному розчині та динаміки її активного центру.

Досліджено структурно-функціональні стани каталітичної петлі KFGKS, механізми взаємодії субстратів та інгібітора SB-219383 з активним центром ферменту. Ці результати можуть бути використані для створення нових інгібіторів *MtTyrRS*.

Особистий внесок здобувача. Особисто здійснено інформаційний пошук та аналіз літературних даних за темою роботи. У всіх опублікованих наукових роботах за темою дисертаційної роботи особистий внесок здобувача полягає у: власноруч підготовлених та проведених розрахунках динаміки *MtTyrRS*; визначенні оптимальних умов розрахунків; підготовці топологій силових полів для субстратів, проміжного продукту та інгібіторів; побудові комплексів димеру *MtTyrRS* з тирозином, АТФ, тирозил-аденилатом та інгібітором SB-219383; проведенні розрахунків динаміки димеру *MtTyrRS* в комплексах з різними субстратами; аналізі та інтерпретації отриманих результатів і співставленні їх з літературними даними; обговоренні результатів; написанні наукових робіт та представленні результатів на наукових конференціях. Автор висловлює глибоку подяку д.б.н., професору, член-кореспонденту НАН України О. І. Корнелюку за керівництво роботою, корисні поради в плануванні розрахунків та при обговоренні результатів; к.б.н. А. І. Драгану за участь в обговоренні результатів та їхньої інтерпретації; д.х.н. І. Я. Дубею за допомогу в роботі над дизайном нових інгібіторів. Отримані результати опубліковано в спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові результати було представлено на VII Міжнародній науково-технічній конференції “Актуальні питання біологічної фізики і хімії” (Севастополь, Україна, 2011), V Конгресі українського біофізичного товариства (Світязь, Україна, 2011), 4-й міжнародній конференції International IMBG Conference for Young Scientists “Molecular Biology: Advances and Perspectives” (Київ, Україна, 2011), Міжнародній науковій конференції “Multi-Pole Approach to Structural Biology” (Варшава, Польща, 2011), Науково-практичному курсі FEBS “Physical Chemistry of Biointerfaces II” (Сан-Себастьян, Іспанія, 2012), IX Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, Україна, 2013), VII Конференції молодих науковців Інституту молекулярної біології і

генетики НАН України присвяченої 175-річчю з дня народження О. Я. Данилевського (Київ, Україна, 2013), 9th European Biophysics Congress (Лісабон, Португалія, 2013), FEBS EMBO 2014 Conference (Париж, Франція, 2014), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014), 15 FEBS Young Scientist's Forum (Берлін, Німеччина, 2015), 40th FEBS Congress (Берлін, Німеччина, 2015), 10th European Biophysics Congress (Дрезден, Німеччина, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 18 наукових праць, що включають 6 статей, з яких 5 у фахових виданнях, 2 з яких належать до наукометричної бази даних “Scopus”, та 12 публікацій за матеріалами і тезами у збірниках вітчизняних і закордонних з’їздів та конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, експериментальної частини, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків та списку використаних джерел, який охоплює 201 найменування. Дисертацію викладено на 135 сторінках стандартного машинопису, вона містить 40 рисунків та 14 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Кристаліграфічна структура *MtTyrRS* (PDB код – 2JAN) є неповною, тому для отримання повнорозмірної структури ферменту проведено комп’ютерне моделювання відсутніх фрагментів амінокислотної послідовності в субодиниці А (Met1-Met4, Gly424) та в субодиниці Б (Met1-Met4, Pro81-Asp93). Для добудови коротких фрагментів послідовностей на кінцевих ділянках поліпептидного ланцюга використано веб-сервіс ModLoop [Fiser et al., 2000; Fiser and Sali, 2003]. Моделювання конформації послідовності Pro81-Asp93 в субодиниці Б проведено методом структурної суперпозиції, використовуючи субодиницю А як структурний шаблон.

Побудову комплексів *MtTyrRS* з субстратами, проміжним продуктом реакції тирозил-аденілатом та інгібітором проведено методом структурної суперпозиції, використовуючи кристаліграфічні структури TyrRS бактерій у комплексах з лігандами. Використано структуру *E. coli* TyrRS у комплексі з L-тирозином (PDB код – 1X8X) [Kobayashi et al., 2005], *T. thermophilus* TyrRS у комплексі з АТФ (PDB код – 1H3E) [Yaremchuk et al., 2002], *E. coli* TyrRS у комплексі з аналогом тирозил-аденілату (PDB код – 1VBM) [Kobayashi et al., 2005] та *S. aureus* TyrRS у комплексі з інгібітором SB-219383 (PDB код – 1JH) [Qiu et al., 2001]. Таким чином, отримано структури димеру *MtTyrRS* у комплексах з L-тирозином, L-тирозином та АТФ, тирозил-аденілатом та інгібітором SB-219383.

Всі розрахунки методом комп’ютерного моделювання молекулярної динаміки та аналіз траєкторій проводили за допомогою пакету програм GROMACS 4.5 [Hess et al., 2008]. Для кожної системи отримано щонайменше

три траєкторії молекулярної динаміки тривалістю до 100 нс кожна, з кожним з двох використаних силових полів: AMBER99SB-ILDN [Ponder et al., 2003] та CHARMM27 [Bjellmar et al., 2010]. Підготовка системи була наступною: спочатку білок поміщали в ємність з водою типу TIP3P [Jorgensen and Madura, 1983] з мінімальною відстанню до стінок ємності 1 нм. Заряд системи було нейтралізовано додаванням іонів Na^+ та Cl^- при концентрації 150 мМ. Спочатку було проведено мінімізацію енергії системи, потім систему було урівноважено в три етапи шляхом накладання гармонічних обмежуючих потенціалів на важкі атоми білка. Чисельне інтегрування проводили з кроком 2 фс. Довжини ковалентних зв'язків фіксували за алгоритмом LINCS [Hess et al., 1997]. Електростатичні взаємодії обчислювали методом PME [Essmann et al., 1995]. Температуру підтримували постійною при 310 К за допомогою термостату V-rescale [Bussi et al., 2007]. Тиск системи контролювали баростатом Parrinello-Rahman [Parrinello and Rahman, 1981], який був рівний 1 атм.

Обчислення енергій проведено за допомогою програми `g_energy` пакету програм GROMACS 4.5 [Hess et al., 2008]. Енергії взаємодій між інгібіторами та активним центром ферменту становлять суму енергії ван-дер-ваальсових взаємодій, яку описано потенціалом Ленард-Джонса, та енергії електростатичних взаємодій, яку описано за законом Кулона.

Розрахунки молекулярної динаміки проведено за допомогою обчислювального кластеру Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та інших кластерів Українського національного ґриду, використовуючи сервіси віртуальної лабораторії MolDynGrid [Salnikov et al., 2010].

Результати досліджень та їх обговорення

Просторова структура димеру *MtTyrRS*. Кристалографічна структура димеру *MtTyrRS* (PDB код – 2JAN) має роздільну здатність 2,9 Å. Відсутні амінокислотні залишки на кінцевих ділянках поліпептидного ланцюга в структурі субодиниці А (Met1-Met4, Gly424) та субодиниці Б (Met1-Met4) побудовано за допомогою спеціалізованого веб-сервісу ModLoop [Fiser et al., 2000; Fiser and Sali, 2003]. Добудову довшого фрагменту послідовності Pro81-Asp93 в структурі субодиниці Б проведено методом структурної суперпозиції використовуючи субодиницю А як структурний шаблон. Після побудови структури *MtTyrRS* (рис. 1) проведено мінімізацію енергії структури за допомогою веб-серверу Yasara Energy Minimization Server, який використовує силове поле Yasara [Krieger et al., 2009]. Порівняльний аналіз якості кристалографічної та оптимізованої структури показав, що отримана структура димеру не містить структурних помилок (перекривання атомів, неправильні конформації пептидних груп).

Молекулярна динаміка *MtTyrRS* у вільному стані. Після побудови відсутніх фрагментів та мінімізації енергії структури ферменту, проведено моделювання молекулярної динаміки структури димеру *MtTyrRS*, в часовому інтервалі 100 нс. Виявлено значну конформаційну рухливість каталітичних петель ферменту, та С-кінцевих доменів, відносно каталітичних доменів.

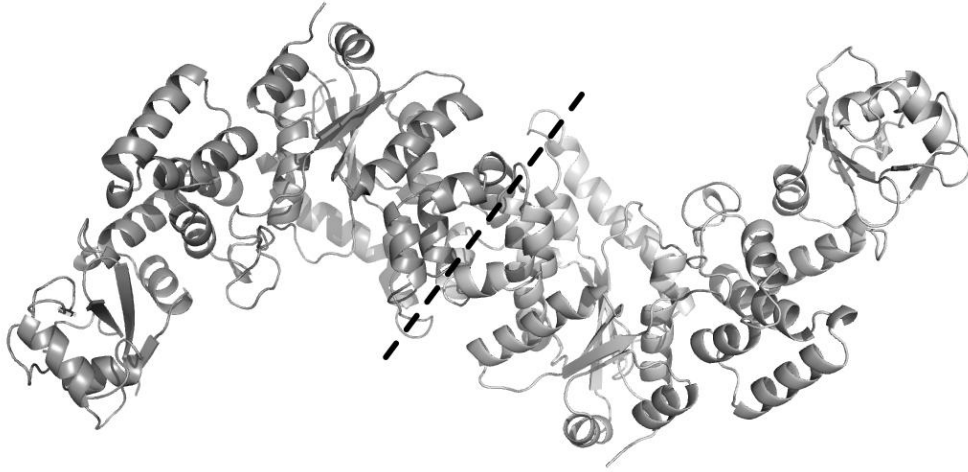


Рис. 1. Третинна структура димеру *MtTyrRS* (інтерфейс взаємодії субодиниць димеру позначено пунктирною лінією)

Вперше показано, що неструктурована каталітична KMSKS-подібна петля (в *MtTyrRS* цей мотив має послідовність KFGKS), яка є характерною для АРСаз I-го класу та з'єднує каталітичний і антикодон-зв'язувальний домени, динамічно утворює антипаралельні β -стренди (рис. 2). У кристалографічній

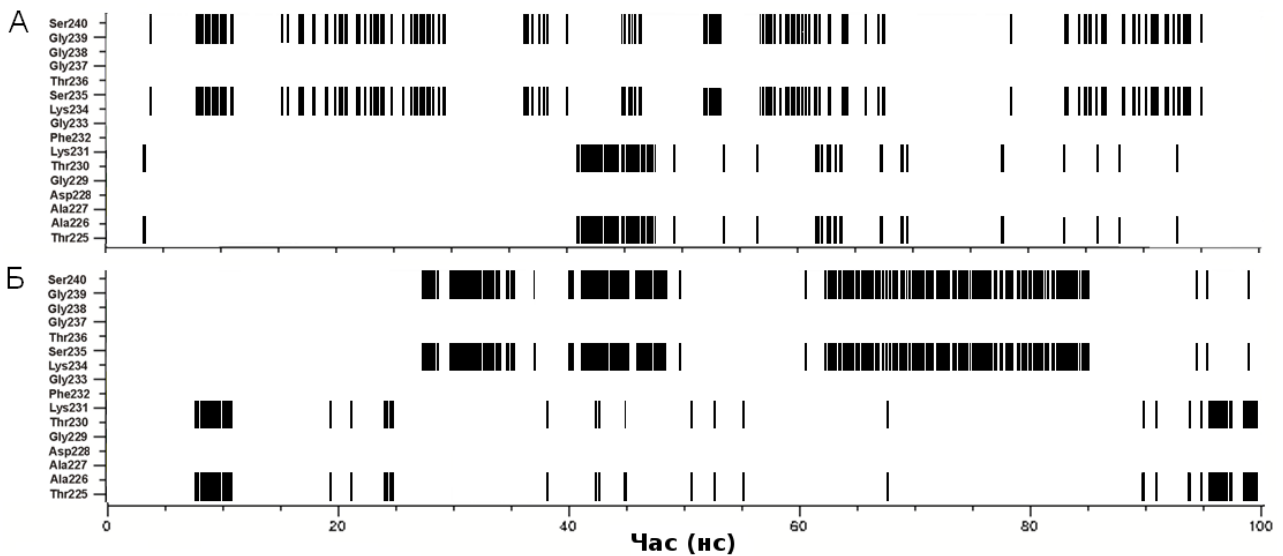


Рис. 2. Формування β -шпильок в каталітичній петлі KFGKS субодиниці А димеру *MtTyrRS* у вільному стані у ході динаміки (силове поле AMBER ff99SB-ILDN (А) та CHARMM27 (Б))

структурі димеру *MtTyrRS* у вільному стані петля є неструктурованою, тобто не має елементів вторинної структури. Проте, в ході динаміки петля утворює два динамічні антипаралельні β -стренди на бокових фрагментах каталітичної петлі KFGKS. Ці β -структури є лише динамічними, а не регулярними елементами вторинної структури білка. Середня тривалість існування цих β -стрендів складає від 19 пс до 53 пс, тобто їх можна порівняти з часом життя водневих зв'язків між молекулами води в розчині [Keutsch et al., 2001]. Цікаво, що швидкі динамічні взаємодії молекул води з ДНК (середній час взаємодії молекул води з

ДНК становить близько 20 пс) призводять до стабілізації дуплексу ДНК у В-формі [Pal et al., 2003]. Можна припустити, що виявлені динамічні β -шпильки можуть стабілізувати каталітичну петлю у специфічній М-подібній конформації. Вірогідно, ця конформація є функціональною та дозволяє зв'язатися з субстратами, яке теж відбувається через водневі (H-) зв'язки. Першу антипаралельну β -шпильку формують залишки Thr225-Ala226 та Thr230-Lys231, а друга складається із залишків Lys234-Ser235 і Ser240-Gly239. Слід зазначити, що каталітичні залишки Lys231, Lys234 і Ser235, які відносяться до каталітично важливого мотиву KFGKS, беруть участь в формуванні β -шпильок, і каталітичний мотив стає більш структурованим в активному центрі ферменту (рис. 3 А).

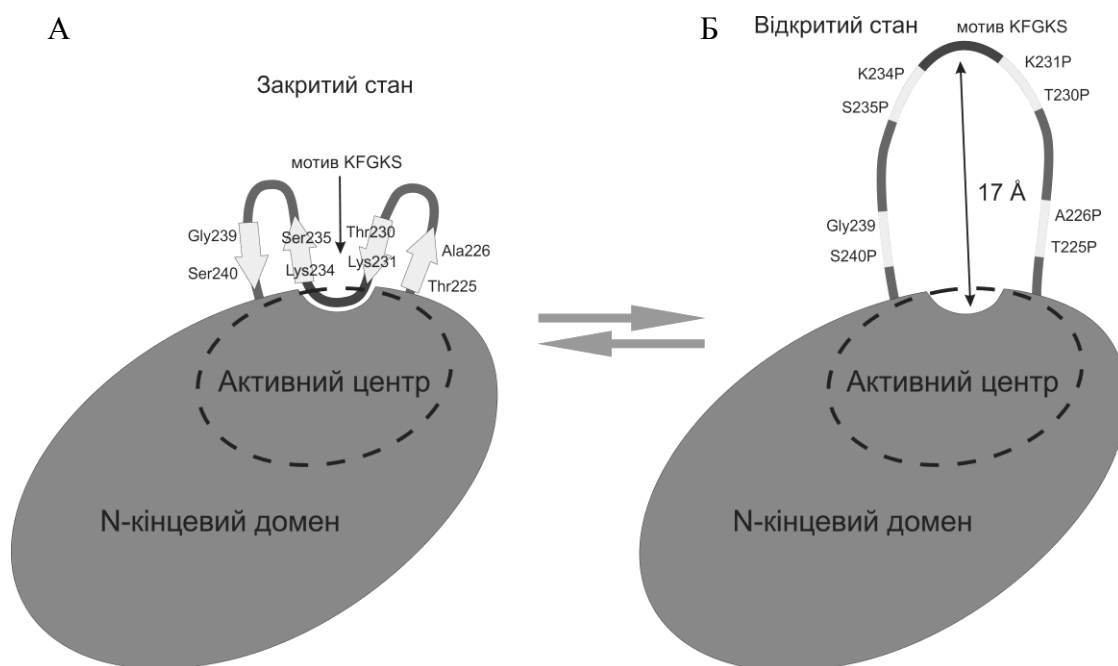


Рис. 3. Схематичне зображення каталітичної петлі KFGKS *MtTyrRS* у двох структурних станах: "закритому" – М-подібна структура, стабілізована β -шпильками (А), та "відкритому" – О-подібна структура у мутантної форми *MtTyrRS* (Б)

Структура каталітичної петлі KFGKS у *TyrRS* має М-подібну форму, центральна частина якої спрямована до активного центру. Однак, така М-подібна форма неструктурованого фрагменту поліпептидного ланцюга може бути енергетично не вигідна і без специфічних факторів, які можуть її стабілізувати, вона може відкриватися в кільцеподібну відкриту структуру. Формування β -стрендів, яке спостерігається в ході динаміки на бокових частинах каталітичної петлі, обмежує вільне переміщення (ступінь свободи) поліпептидного ланцюга та грає роль таких специфічних факторів. Енергія формування β -стрендів може ефективно стабілізувати М-подібну конформацію каталітичної петлі, спрямовуючи каталітичну частину петлі в кишеню

активного центру (“закритий” стан), підтримуючи петлю готовою до зв’язування з субстратами.

Для того, щоб перевірити нашу гіпотезу, що β -шпильки на бокових частинах каталітичної петлі в активному центрі ферменту підтримують петлю у закритому М-подібному стані, спрямовуючи каталітичний мотив KFGKS в кишеню активного центру, ми провели моделювання мутантної форми *MtTyrRS*, замінивши на пролін залишки, які беруть участь у формуванні β -стрендів: T225P, A226P, T230P, K231P, K234P, S235P і S240P. У мутантній формі *MtTyrRS*, каталітична петля не може формувати β -структури. Без β -стрендів каталітична петля починає виходити з активного центру ферменту на початку динаміки *MtTyrRS*. М-подібна, “закрита” форма петлі (початкова конформація петлі) протягом 20 нс змінюється на “відкриту” кільцеподібну структуру (О-подібну структуру), яка повністю експонована (рис. 3 Б). О-подібна структура є енергетично вигідною за відсутності β -шпильок на бокових частинах каталітичної петлі та залежить від внутрішніх процесів дифузії. В результаті переходу від “закритого” до “відкритого” стану каталітичний мотив KFGKS переміщується на 17 Å. Цей результат прояснює важливу роль структури β -шпильок у підтримці функціональної М-подібної структури каталітичної петлі KFGKS в активному центрі ферменту.

Описане формування β -структур в каталітичній петлі узгоджується з експериментальними даними, отриманими для гомологічного білка TyrRS з *E.coli*. Подібні β -шпильки в каталітичній петлі виявлені у кристалографічній структурі *E.coli* TyrRS в комплексі з проміжним продуктом реакції – тирозил-аденілатом (PDB код – 1VBM) [Kobayashi et al., 2005].

Асиметричність структури димеру *MtTyrRS* в розчині. Подібно до каталітичних петель, С-кінцеві домени димеру *MtTyrRS* відносяться до найбільш рухливих елементів ферменту. Кристалографічна структура димеру *MtTyrRS* має симетричну форму. Проте згідно наших даних, динаміка *MtTyrRS* у розчині показує, що рухливість С-кінцевих доменів призводить до порушення симетрії димеру ферменту. Конформаційні рухи С-кінцевих доменів можна описати як віддалення та наближення до каталітичних N-кінцевих доменів.

Для кількісної оцінки зміщення С-кінцевих доменів визначено кут між С-альфа атомами Tyr171, Arg59 та Val409. Залишки Tyr171 та Arg59 знаходяться у коровій частині N-кінцевого домену, Val409 розміщений в коровій частині С-кінцевого домену (рис. 4 А). Середні значення кутів α та γ , отримані з 100 нс динаміки *MtTyrRS*, складають $87,3^\circ$ та $91,1^\circ$ відповідно. Проте, заміна значень цих кутів протягом 100 нс динаміки ферменту (рис. 4 Б) показує, що структура димеру втрачає симетрію в процесі динаміки. В інтервалі 10 – 45 нс різниця значень кутів незначна і структура зберігає симетрію. Однак далі С-кінцеві домени зміщуються, що супроводжується значними змінами значень кутів α та γ : значення кута α зменшується, в той час як значення кута γ зростає. Це свідчить про порушення симетрії димеру, значні відхилення С-кінцевих доменів призводять до асиметричної структури димеру *MtTyrRS*.

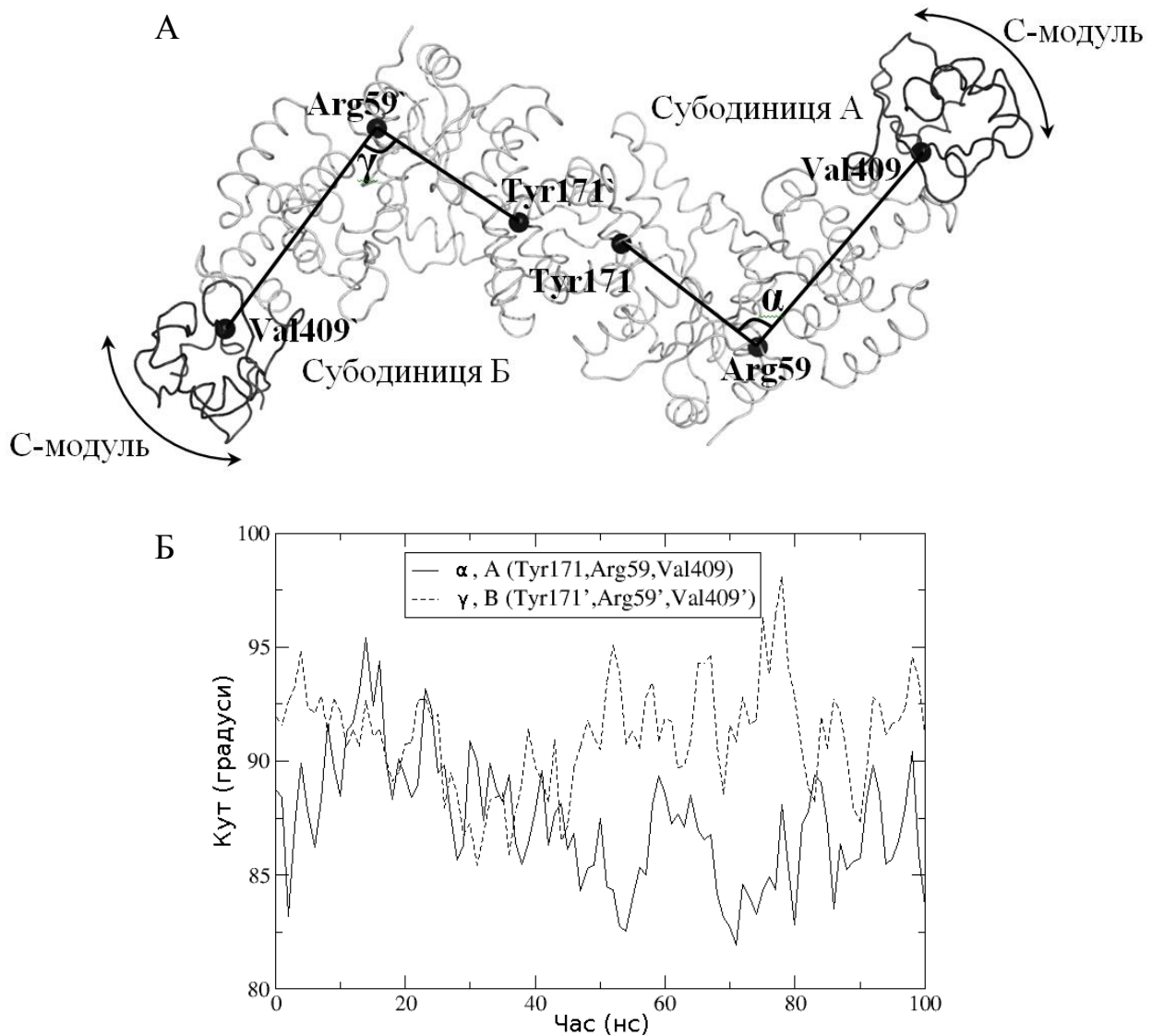


Рис. 4. Рухи С-кінцевих доменів *MtTyrRS* призводять до втрати симетрії димеру. Кут між залишками Tyr171, Arg59 і Val409 (α) (субодиниця А) та Tyr171', Arg59' і Val409' (γ) (субодиниця Б), який описує рухи С-кінцевих доменів відносно N-кінцевих доменів (А). Зміни кутів α та γ в ході динаміки *MtTyrRS* (Б)

Молекулярна динаміка MtTyrRS у комплексах з різними субстратами.

Проведено дослідження динаміки димеру *MtTyrRS* у комплексах з субстратами L-тирозином і АТФ, а також проміжним продуктом реакції тирозил-аденілатом (рис. 5). Зв'язування L-тирозиону відбувається через Н-зв'язки та характеризується конформаційною жорсткістю, оскільки сайт зв'язування L-тирозиону знаходиться в коровій частині згортки Россмана, характерної для аміноацил-тРНК синтетаз I-го класу. У зв'язуванні АТФ в активному центрі важливу роль відіграють Lys231, Phe232 та Lys234 каталітичного мотиву KFGKS, позитивно заряджені залишки лізину взаємодіють з негативно зарядженими фосфатними групами АТФ. Характерні для аміноацил-тРНК синтетаз каталітичні послідовності HAGH та KFGKS відповідають за

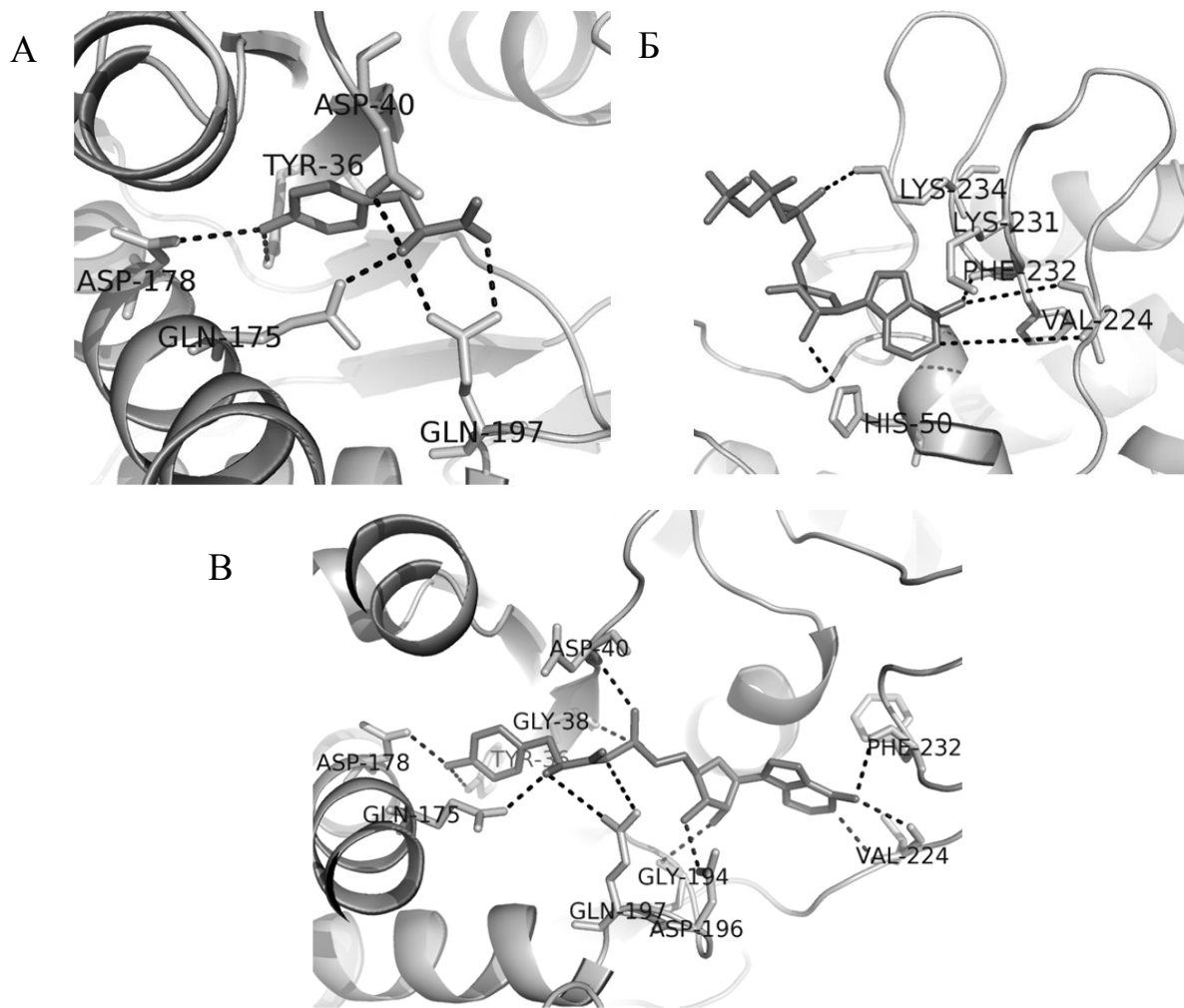


Рис. 5. Зв'язування в активному центрі *MtTyrRS* L-тирози́ну (А), АТФ (Б) та тирозил-аденілату (В). Н-зв'язки показано пунктирними лініями

зв'язування АТФ в активному центрі. Оскільки ключове значення в зв'язуванні АТФ має каталітична петля KFGKS, сайт зв'язування АТФ має підвищену конформаційну рухливість. Проміжний продукт реакції – тирозил-аденілат – займає всю кишеню активного центру, взаємодіючи з каталітичною петлею. Зв'язування відбувається через Н-зв'язки, включаючи залишки, які взаємодіють з L-тирози́ном та АТФ.

Конформація каталітичної петлі у комплексах з субстратами знаходиться у закритому стані (всередині активного центру ферменту) та сильно залежить від наявності субстрату в активному центрі (рис. 6). Перебуваючи в закритому стані, гнучкість петлі дозволяє набувати конформацій, специфічних для взаємодій з різними субстратами. Каталітична петля може перебувати у трьох різних закритих станах: конформація петлі, коли фермент знаходиться у вільному стані (S_{free}^C), коли в активному центрі знаходиться АТФ (S_{ATP}^C) та конформація каталітичної петлі, коли в активному центрі зв'язаний тирозил-аденілат (S_{YMP}^C). Подібність між цими трьома конформаціями полягає у тому, що каталітична петля, зокрема каталітичний мотив KFGKS, знаходиться

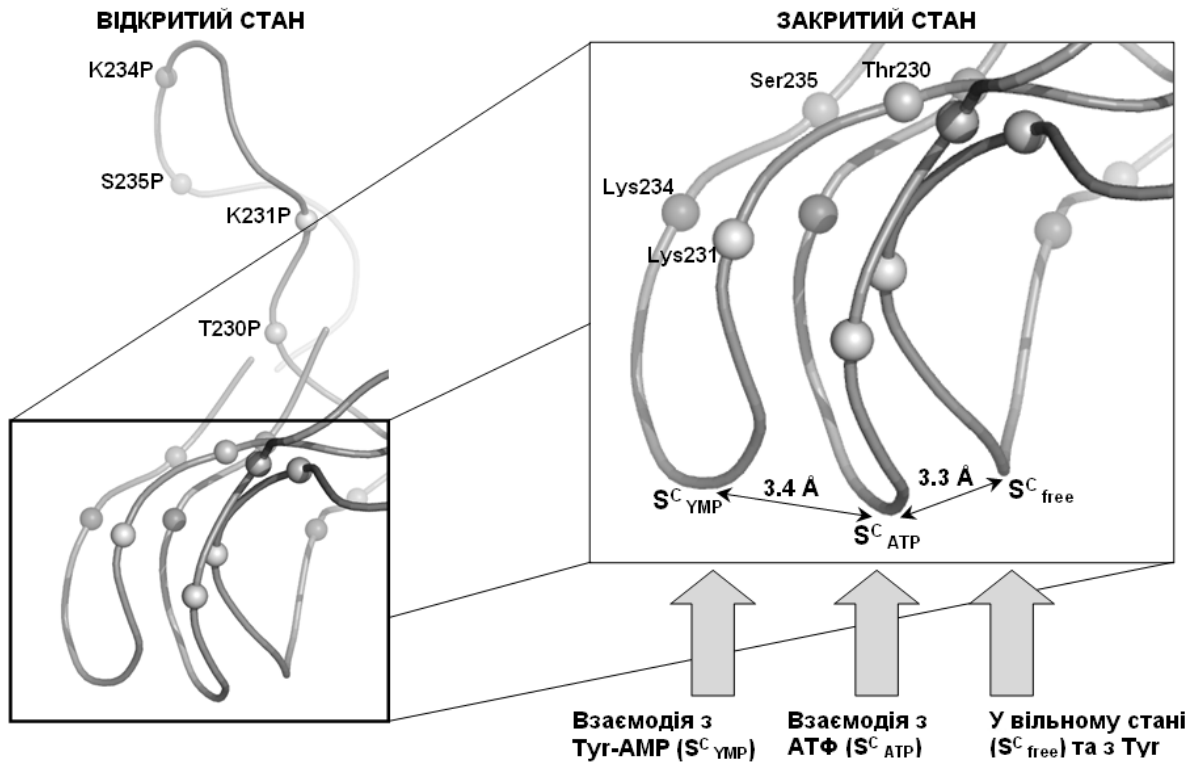


Рис. 6. “Відкрита” О-подібна та “закрита” М-подібна конформації каталітичної петлі. В залежності від субстрату в активному центрі петля приймає різні конформації. При відсутності β -стрендів у каталітичній петлі мутантної форми, петля виходить з активного центру протягом 20 нс, переходячи у “відкритий” стан (О-подібна конформація)

всередині активного центру ферменту (“закритий” М-подібний стан), а її положення/конформація в кишені активного центру визначається субстратом. Конформація KFGKS петлі з L-тирозином в активному центрі подібна до конформації петлі у вільному стані ферменту (S^C_{free}). Це можна пояснити тим фактом, що сайт зв’язування L-тирозину в кишені активного центру знаходиться у протилежній частині від петлі, тобто далеко від петлі, тому вона не формує Н-зв’язків з L-тирозином. Безпосередні взаємодії залишків Lys231 та Lys234 з АТФ призводять до зсуву каталітичного мотиву в кишені активного центру на 3,3 Å відносно конформації петлі у вільному стані ферменту (S^C_{free}), стабілізуючи конформацію S^C_{ATP} . У комплексі *MtTyrRS* з тирозил-аденілатом петля специфічно взаємодіє з проміжним продуктом, адаптуючи нову конформацію S^C_{YMP} та змінюючи своє положення відносно конформації петлі у вільному стані ферменту на 6,7 Å.

Структура і динаміка активного центру димеру *MtTyrRS* в комплексі з інгібітором SB-219383 та дизайн нових інгібіторів. Одним з найбільш досліджених інгібіторів бактерійних TyrRS є інгібітор SB-219383, який було створено для інгібування *S. aureus* TyrRS [Greenwood et al., 2002]. SB-219383 міцно зв’язується в активному центрі *MtTyrRS*, формуючи дев’ять Н-зв’язків (рис. 7). Інгібітор взаємодіє з сайтом зв’язування L-тирозину та частково АТФ.

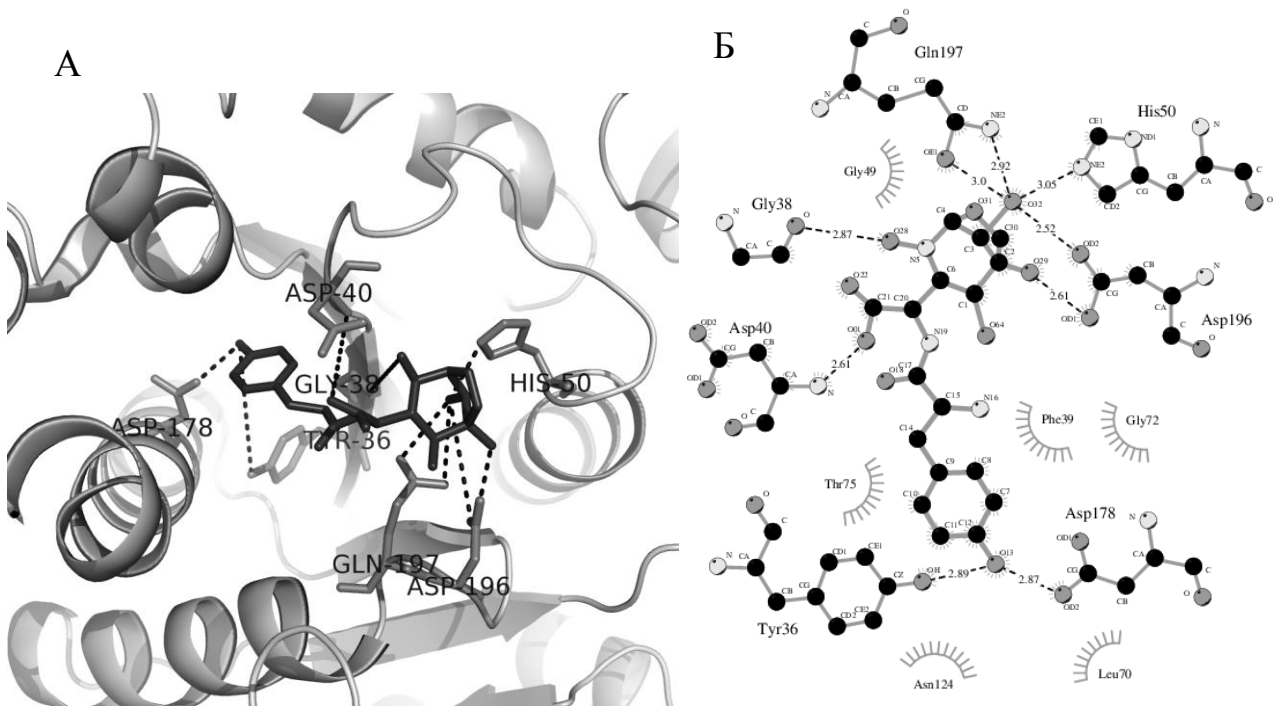


Рис. 7. Зв'язування в активному центрі *MtTyrRS* інгібітора SB-219383 (А) та схематичне зображення водневих зв'язків між інгібітором та ферментом (Б)

Його розміри менші за розміри проміжного продукту – тирозил-аденілату – тому інгібітор не взаємодіє з каталітичною петлею. Важливою відмінністю між активними центрами *TyrRS* бактерій та *TyrRS* людини є будова каталітичної петлі та каталітичного мотиву зокрема. KMSSS послідовність в *TyrRS* людини суттєво відрізняється від послідовності в *TyrRS* бактерій та містить лише один залишок лізину, що призводить до відмінностей каталітичних механізмів ферментів. Відомо, що в бактерійних *TyrRS* KMSKS-подібний мотив (KFGKS у *MtTyrRS*) грає важливу роль у каталітичному механізмі, тому інгібітори, які будуть взаємодіяти з цим мотивом, матимуть більшу афінність до бактерійних *TyrRS*, ніж до еукаріотних гомологів [Austin and First, 2002].

Дизайн нових інгібіторів активного центру *MtTyrRS* проводили на основі структури інгібітора SB-219383. Оскільки SB-219383 не взаємодіє з каталітичною петлею KFGKS, його було модифіковано таким чином, щоб забезпечити взаємодію нових інгібіторів з каталітичною петлею в активному центрі (рис. 8). Запропоновано два нові інгібітори активного центру *MtTyrRS*: SB-219383-a та SB-219383-b. Корову структуру інгібітора SB-219383 дещо спростили, видаливши містковий атом карбону, що утворював біциклічний фрагмент. До атома кисню, звільненого від ковалентного зв'язку з цим атомом карбону, було приєднано хімічні групи, здатні забезпечити взаємодію з каталітичною петлею. Вибір хімічних груп для побудови нових інгібіторів здійснювався з урахуванням властивостей поверхні кишені активного центру *MtTyrRS*, з якою повинні взаємодіяти додані групи.

Запропоновані нові двоцентрові інгібітори SB-219383-a та SB-219383-b

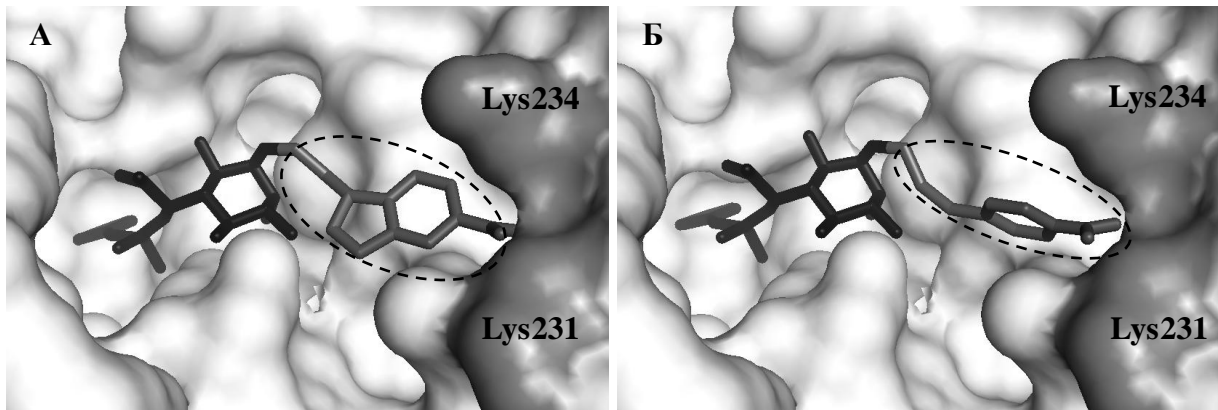


Рис. 8. Поверхня активного центру *MtTyrRS* у комплексах з двоцентровими інгібіторами SB-219383-a (А) і SB-219383-b (Б) (пунктирною лінією виділено добудовані фрагменти інгібіторів, які взаємодіють з каталітичною петлею). Карбоксильні групи інгібіторів формують електростатичні взаємодії із залишками Lys231 та Lys234 каталітичної петлі KFGKS

займають всю кишеню активного центру *MtTyrRS*, одночасно зв'язуючись з сайтами зв'язування L-тирозину і АТФ та взаємодіючи з каталітичною петлею KFGKS, подібно до проміжного продукту реакції – тирозил-аденілату. Порівняльна динаміка *MtTyrRS* у комплексах з SB-219383 та новими інгібіторами показала, що ці інгібітори мають нижчі енергії взаємодій з активним центром відносно SB-219383. Різниця між енергіями взаємодій інгібіторів SB-219383 та SB-219383-a становить 116,87 кДж/моль, різниця між енергіями взаємодій інгібіторів SB-219383 та SB-219383-b – 123,83 кДж/моль. Двоцентрові інгібітори SB-219383-a та SB-219383-b взаємодіють з каталітичним мотивом KFGKS протягом всього часу молекулярної динаміки *MtTyrRS* (100 нс), що, вірогідно, може підвищити їхню афінність до бактерійних TyrRS.

ВИСНОВКИ

Проведено дослідження молекулярної динаміки тирозил-тРНК синтетази *M. tuberculosis* у вільному стані та в комплексах з субстратами L-тирозином і АТФ та проміжним продуктом реакції тирозил-аденілатом. Виявлено формування метастабільних β -шпильок в каталітичній KFGKS-петлі ферменту, які стабілізують каталітичну петлю у функціональному стані.

1. Показано, що характерна для APCаз класу I каталітична KFGKS-петля динамічно формує дві антипаралельні метастабільні β -шпильки на бокових частинах петлі, тривалість існування яких складає 19 – 53 пс.

2. Вперше показано, що антипаралельні β -шпильки, які формуються в каталітичній петлі, підтримують петлю у закритій M-подібній конформації, спрямовуючи каталітичний мотив KFGKS до кишені активного центру, тим самим підтримуючи петлю в функціональному стані, готовому до зв'язування з

субстратами. За відсутності β -структур каталітична петля дисоціює від активного центру та переходить у відкритий O-подібний стан.

3. Встановлено, що C-кінцеві домени димеру *MtTyrRS*, які проявляють високу рухливість, рухаються скорельовано. Наближення C-кінцевого домену до каталітичного домену в субодиниці А супроводжується віддаленням C-кінцевого домену від каталітичного домену в субодиниці Б. Такі скорельовані рухи C-кінцевих доменів призводять до формування асиметричної структури ферменту у розчині.

4. M-подібна конформація каталітичної петлі залежить від субстрату в активному центрі. Каталітична петля приймає три різні закриті конформації: закриту конформацію у вільному стані (S_{free}^C), конформацію петлі при наявності в активному центрі АТФ (S_{ATP}^C) та при наявності зв'язаного тирозил-аденілату (S_{UMP}^C).

5. Запропоновано нові двоцентрові інгібітори *MtTyrRS* SB-219383-а та SB-219383-б, які зв'язуються з АТФ-зв'язуючим центром і каталітичним мотивом KFGKS та мають нижчі енергії взаємодій з ферментом за відомий інгібітор SB-219383.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях

1. Микуляк В. В. Динамічне формування β -тяжової структури в активному центрі тирозил-тРНК синтетази еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* за даними молекулярної динаміки / В. В. Микуляк, О. І. Корнелюк // Доповіді НАН України. – 2012. – №5. – С. 158–162. (*Особистий внесок: проведено моделювання динаміки *MtTyrRS*, здійснено аналіз траєкторій та обробку результатів*).
2. Mykuliak V. V. The mechanisms of substrates interaction with the active site of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase studied by molecular dynamics simulations / V. V. Mykuliak, A. I. Kornelyuk // *Biopolymers and Cell*. – 2014. – Vol. 30, N. 2. – P. 157–162. Видання належить до наукометричної бази даних “Scopus”. (*Особистий внесок: проведено підготовку комплексів *MtTyrRS* з різними субстратами та обчислення динаміки, здійснено аналіз взаємодій субстратів з активним центром *MtTyrRS**).
3. Микуляк В. В. Структура і динаміка тирозил-тРНК синтетази *Mycobacterium tuberculosis* у комплексі з інгібітором SB-219383 / В. В. Микуляк, О. І. Корнелюк // Доповіді НАН України. – 2014. – № 6. – С. 156–159. (*Особистий внесок: підготовлено комплекс *MtTyrRS* з інгібітором SB-219383, проведено динаміку та виконано аналіз взаємодій інгібітора та ферменту*).
4. Микуляк В. В. Дизайн інгібіторів активного центру тирозил-тРНК синтетази *Mycobacterium tuberculosis* на основі інгібітора SB-219383 / В. В. Микуляк, І. Я. Дубей, О. І. Корнелюк // Доповіді НАН України. –

2014. – № 10. – С. 167–174. (*Особистий внесок: проведено редагування інгібітора SB-219383, побудову комплексів MtTyrRS з цими інгібіторами, проведено моделювання динаміки та здійснено аналіз траєкторій динаміки*).
5. Mykuliak V. V. Structural states of the flexible catalytic loop of *M. tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase in different enzyme-substrate complexes / V. V. Mykuliak, A. I. Dragan, A. I. Kornelyuk // Eur Biophys J. – 2014. – Vol. 43, N. 12. – P. 613–622. Видання належить до наукометричної бази даних “Scopus”. (*Особистий внесок: підготовка комплексів MtTyrRS з субстратами, проведення розрахунків динаміки та аналіз результатів досліджень*).

Статті в інших виданнях

6. Микуляк В. В. Конформаційна рухливість тирозил-тРНК синтетази еубактерії *M. tuberculosis* по даним комп'ютерного моделювання молекулярної динаміки / В. В. Микуляк, О. І. Корнелюк // Фізика живого. – 2011. – Т 19, № 2. – С. 4–8. (*Особистий внесок: проведено обчислення динаміки MtTyrRS, здійснено аналіз та обробку результатів досліджень*).

Тези наукових доповідей

7. Микуляк В. В. Молекулярна динаміка тирозил-тРНК синтетази еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* в розчині за фізіологічних умов / В. В. Микуляк, О. І. Корнелюк // Матеріали VII Міжнародної науково-технічної конференції “Актуальні питання біологічної фізики і хімії” (26–30 квітня 2011, Севастополь). – Севастополь, 2011. – С. 173-175.
8. Микуляк В. В. Динамічне формування β -тяжевої структури в активному центрі тирозил-тРНК синтетази еубактерії *M. tuberculosis* по даним молекулярної динаміки / В. В. Микуляк, О. І. Корнелюк // Збірник тез V з'їзду українського біофізичного товариства (22–25 червня 2011, Світязь). – Світязь, 2011. – С. 93.
9. Mykuliak V. V. Molecular dynamics simulation of conformational mobility of *M. tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase in solution / V. V. Mykuliak, A. I. Kornelyuk // The 4-th International IMBG Conference for Young Scientists “Molecular Biology: Advances and Perspectives”: abstract book (14–17 September 2011, Kyiv). – Kyiv, 2011. – P. 55.
10. Mykuliak V. Conformational changes of *M. tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase revealed from grid based molecular dynamics simulations / V. Mykuliak, A. Kornelyuk // Multi-Pole Approach to structural biology: abstract book (16–19 November 2011, Warsaw). – Warsaw, Poland, 2011. – P. P76.
11. Mykuliak V. Dynamical structure changes of *M. tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase revealed from molecular dynamics simulations using grid technologies / V. Mykuliak, A. Kornelyuk // Physical Chemistry of

- Biointerfaces II: abstract book (9–14 July 2012, San Sebastian). – San Sebastian, Spain, 2012. – P. 18.
12. Микуляк В. Конформаційні зміни каталітичної петлі KMSKS у присутності лігандів в активному центрі тирозил-тРНК синтетази еубактерії *M. tuberculosis* / В. Микуляк, О. Корнелюк // “Молодь і поступ біології”: збірник тез ІХ Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (16–19 квітня 2013, Львів). – Львів, 2013. – С. 21.
 13. Mykuliak V. Conformational adaptations of catalytic loop in complexes of *M. tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase with different substrates according to the molecular dynamics / V. Mykuliak, A. Kornelyuk // VII Conference of Young Scientists: Biopolymers and Cell (28–29 May 2013, Kyiv). – Kyiv, 2013. – V. 29, S. I. – P. 13.
 14. Mykuliak V. Substrate dependent conformational changes of catalytic loop in *M. tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase / V. Mykuliak, A. Kornelyuk // 9th European Biophysics Congress: Eur Biophys J (13–17 July 2013, Lisbon). – Lisbon, Portugal, 2013. – N. 42, Suppl. 1, S. 197. – P. 614.
 15. Mykuliak V. V. The role of dynamic β -hairpin structures in the catalytic loop of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase / V. V. Mykuliak, A. I. Dragan, A. I. Kornelyuk // FEBS EMBO 2014 Conference: FEBS Journal (30 August –4 September 2014, Paris) – Paris, France, 2014. – V. 281, Suppl. 1. – P. 645-646.
 16. Микуляк В. В. Структура і динаміка тирозил-тРНК синтетази *Mycobacterium tuberculosis* у комплексі з інгібітором SB-219383 / В. В. Микуляк, О. І. Корнелюк // XI Український біохімічний конгрес: Укр Біохім Журн (6-10 жовтня 2014, Київ). – Київ, 2014. – Т. 86, № 5, S. 1. – С. 69.
 17. Mykuliak V. Molecular dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase with different substrates in the active site / V. Mykuliak, A. Kornelyuk // 40th FEBS Congress: FEBS Journal (4–9 July 2015, Berlin). – Berlin, Germany, 2015. – V. 282, Suppl. 1. – P. 329.
 18. Mykuliak V. Analogues of SB-219383 as novel inhibitors of *M. tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase / V. Mykuliak, I. Dubey, A. Kornelyuk // 10th European Biophysics Congress: Eur Biophys J (18–22 July 2015, Dresden). – Dresden, Germany, 2015. – N. 44, Suppl. 1, S. 60. – P. 68.

АНОТАЦІЯ

Микуляк В.В. Молекулярна динаміка тирозил-тРНК синтетази еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* та формування метастабільних елементів в активному центрі. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2015.

Дисертацію присвячено дослідженню молекулярної динаміки тирозил-тРНК синтетази еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* у водно-іонному розчині.

Проведено дослідження динаміки ферменту у вільному стані, у комплексах з різними субстратами та інгібіторами.

Вперше показано динамічне формування антипаралельних β -стрендів у неструктурованій каталітичній KMSKS-подібній петлі, яка характерна для аміноацил-тРНК синтетаз класу I. Виявлено, що β -структури, які динамічно формуються у ході динаміки ферменту, підтримують каталітичну петлю в “закритій” конформації, спрямовуючи каталітичний KMSKS-подібний мотив у активний центр.

Проведено дизайн нових інгібіторів ферменту на основі структури відомого інгібітора тирозил-тРНК синтетаз бактерій SB-219383.

Ключові слова: тирозил-тРНК синтетаза, *Mycobacterium tuberculosis*, β -тяж, каталітична петля, молекулярна динаміка, дизайн інгібіторів.

АННОТАЦІЯ

Микуляк В.В. Молекулярная динамика тирозил-тРНК синтетазы эубактерии *Mycobacterium tuberculosis* и формирование метастабильных элементов в активном центре. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2015.

Диссертация посвящена исследованию молекулярной динамики тирозил-тРНК синтетазы эубактерии *Mycobacterium tuberculosis* в водно-ионном растворе. Проведено исследование динамики фермента в свободном состоянии и в комплексах с субстратами и промежуточным продуктом: L-тирозин, АТФ и тирозил-аденилат. Также изучена динамика фермента в комплексах с ингибитором SB-219383.

Исследование динамики белков является одной из наиболее актуальных и сложных задач современной биофизики, а также является необходимой составляющей процесса исследования каталитического механизма или механизма ингибирования фермента.

Впервые показано формирование антипараллельных β -тяжей в неструктурированной каталитической KMSKS-подобной петле, характерной для аминоацил-тРНК синтетаз класса I. В кристаллографической структуре каталитическая петля находится в неструктурированном состоянии, т.е. не имеет регулярной вторичной структуры. Выявленные в динамике β -шпильки не относятся к регулярной вторичной структуре белка, а динамически формируются в каталитической петле на протяжении всей динамики (100 нс). Показано, что формируясь динамически, β -структуры поддерживают каталитическую петлю в “закрытой” M-подобной конформации, направляя каталитический KMSKS-подобный мотив в активный центр. При отсутствии β -шпилек в каталитической петле, петля выходит из кармана активного центра, принимая “открытую” O-подобную конформацию, при этом каталитический мотив сдвигается на 17 Å.

Показана взаимосвязь данных динамики с экспериментальными данными. Похожие β -структуры найдены в кристаллографической структуре *E. coli* TyrRS в комплексе с аналогом промежуточного продукта реакции – тирозил-аденилата.

Показано, что в зависимости от связанного субстрата в активном центре, каталитическая петля способна адаптировать конформацию путем взаимодействия с субстратом. Пребывая в закрытом состоянии, гибкость петли позволяет принимать конформации, которые специфичны для взаимодействий с различными субстратами. Каталитическая петля может находиться в трех различных закрытых состояниях: когда фермент находится в свободном состоянии (S_{free}^C), когда в активном центре находится АТФ (S_{ATP}^C) и когда в активном центре связан тирозил-аденилат (S_{UMP}^C). Конформация петли с L-тирозином в активном центре подобна конформации петли в свободном состоянии фермента (S_{free}^C), поскольку сайт связывания L-тирозина в кармане активного центра находится в противоположной части от петли и не формирует водородных связей с L-тирозином.

В работе исследована динамика тирозил-тРНК синтетазы эубактерии *Mycobacterium tuberculosis* в комплексе с известным ингибитором тирозил-тРНК синтетаз бактерий SB-219383. На основе структуры этого ингибитора проведен дизайн новых ингибиторов фермента, которые взаимодействуют с каталитической петлей. Известно, что у бактериальных TyrRS KMSKS-подобный мотив играет важную роль в каталитическом механизме, поэтому ингибиторы, которые будут взаимодействовать с этим мотивом имеют большую аффинность к бактериальным TyrRS, чем у эукариотических гомологов.

Ключевые слова: тирозил-тРНК синтетаза, *Mycobacterium tuberculosis*, β -тяж, каталитическая петля, молекулярная динамика, дизайн ингибиторов.

ABSTRACT

Mykuliak V.V. Molecular dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase and formation of metastable elements in the active site. – Manuscript.

Dissertation for the Candidate of biological sciences degree in specialty 03.00.02. – Biophysics. – Taras Shevchenko National University of Kyiv The Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2015.

The present study is dedicated to the investigation of molecular dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase in water-ion solution. The work studied the dynamics of enzyme in the free state and in complexes with different substrates and inhibitors.

It has been shown for the first time dynamic formation of antiparallel β -strands in unstructured KMSKS-like catalytic loop, which is typical for class I of aminoacyl-tRNA synthetases. It was found that β -strands dynamically forming in the course of enzyme molecular dynamics kept catalytic loop in “closed” state, directing KMSKS-like catalytic motif into the active site.

Based on structure of bacterial tyrosyl-tRNA synthetase inhibitor SB-219383, design of new inhibitors of the enzyme was conducted.

Key words: tyrosyl-tRNA synthetase, *Mycobacterium tuberculosis*, β -strand, catalytic loop, molecular dynamics, design of inhibitors.