



УДК 577.32

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

### Структура і динаміка тирозил-тРНК синтетази *Mycobacterium tuberculosis* у комплексі з інгібітором SB-219383

*Інгібітор SB-219383 та його аналоги є класом потенційних інгібіторів бактеріальних тирозил-тРНК синтетаз. Для дослідження динамічних фармакофорних ознак проведено моделювання молекулярної динаміки тирозил-тРНК синтетази еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* у комплексі з інгібітором SB-219383. Показано, що інгібітор зв'язується в активному центрі ферменту, взаємодіючи з ділянкою зв'язування тирозину та фосфатної групи. SB-219383 не взаємодіє з каталітичною петлею KMSKS.*

Тирозил-тРНК синтетаза (TyrRS) є ферментом, який відповідає за приєднання тирозину до відповідної тРНК на дорибосомному етапі синтезу білка [1]. TyrRS еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* (*MtTyrRS*) нами розглядається як перспективна мішень для пошуку та розробки нових антибактеріальних інгібіторів, специфічне інгібування цього ферменту повинно істотно пригнічувати ріст патогенних бактерій [2]. Використовуючи базу даних траєкторій молекулярної динаміки (МД) *MtTyrRS*, ми проводимо віртуальний скринінг нових селективних інгібіторів цього ферменту з врахуванням конформаційної рухливості активного центру. Для дизайну інгібіторів важливим етапом є визначення фармакофорних ознак [3].

Для вивчення динамічних фармакофорних дескрипторів ми досліджували *MtTyrRS* у комплексі з інгібітором SB-219383 методом моделювання МД у часових інтервалах 100 нс. Цей інгібітор та його аналоги є класом потенційних та специфічних інгібіторів бактеріальних тирозил-тРНК синтетаз (TyrRS) [4, 5]. Інгібітор SB-219383 показує конкурентну інгібуючу активність проти *S. aureus* TyrRS з концентрацією напівмаксимального інгібування IC<sub>50</sub> 0,6 нМ, для TyrRS людини IC<sub>50</sub> становить 22 мкМ [4]. Сполуку SB-219383 можна охарактеризувати як Tyr-Gly дипептид, в якому положення C<sub>α</sub> атома гліцину є похідним біциклічного цукру [5].

У даній роботі наведено результати дослідження динамічних фармакофорних ознак інгібітора SB-219383 методом моделювання МД у комплексі з *MtTyrRS*. Досліджено формування водневих зв'язків у ході МД та тривалість їх існування. Визначено механізм зв'язування інгібітора в активному центрі ферменту в розчині.

© В. В. Микуляк, О. І. Корнелюк, 2014

Інгібітор зв'язується в активному центрі *MtTyrRS* з ділянкою взаємодії тирозину та фосфатної групи, не заповнюючи кишеню зв'язування з аденіном та не взаємодіючи з каталітичною петлею.

Димер *MtTyrRS* було підготовлено за схемою, описаною в нашій попередній роботі [6]. Для побудови комплексу *MtTyrRS* з інгібітором використано кристалографічну структуру комплексу *S. aureus* TyrRS з SB-219383 (PDB код — 1JII) [7]. Конформацію зв'язування інгібітора в активному центрі *MtTyrRS* отримано шляхом накладання активних центрів ферментів.

Всі обрахунки МД проведені за допомогою програмного забезпечення GROMACS 4.5 [8] з використанням силових полів AMBER ff99SB-ILDN [9] та CHARMM27 [10]. Було отримано щонайменше по три траєкторії МД з кожним силовим полем. Підготовка системи здійснювалася таким чином. Білок був поміщений в бокс з водою типу TIP3P з мінімальною відстанню до стінок боксу 1 нм. Заряд системи було нейтралізовано шляхом додавання іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{Cl}^-$  при концентрації 150 мМ (близька до фізіологічної). Спочатку було проведено мінімізацію вільної енергії системи, а потім врівноважено шляхом прив'язки важких атомів білка до їхніх вихідних позицій. Інтегрування проводилось з кроком у 2 фс. Довжини зв'язків обраховувались за алгоритмом Lincs, електростатичні взаємодії — за алгоритмом PME. Параметр відсічення (cutoff) було виставлено в 1 нм для всіх типів взаємодій. Температура і тиск підтримувались постійними за алгоритмами V-rescale в 310 К та Parrinello–Rahman в 1 атм відповідно. Всі обчислення МД проведено з використанням сервісів віртуальної лабораторії MolDynGrid (<http://moldyngrid.org>), на кластерах ICYB і ISMA Українського національного гріду [11].

Для візуалізації траєкторій та графічного аналізу структур використано програму PyMOL [12]. Середньоквадратичні відхилення (СКВ) і середньоквадратичні флуктуації (СКФ) розраховані за допомогою програм пакета GROMACS *g\_rms* і *g\_rmsf* відповідно. Для схематичного зображення водневих зв'язків між лігандом та ферментом використано програму LigPlot<sup>+</sup> [13].

Для перевірки стабільності димеру *MtTyrRS* у комплексі з інгібітором SB-219383 було визначено СКВ та СКФ  $\text{C}_\alpha$  атомів від їхніх початкових координат у ході моделювання МД (рис. 1). СКВ свідчать про стабільність ферменту протягом симуляції МД. Аналіз отриманих СКФ показав, що найбільш рухливими елементами димеру є С-кінцеві домени [14] та неструктуровані каталітичні петлі KMSKS [6].

Щоб оцінити зв'язування ліганду в активному центрі *MtTyrRS*, було пораховано всі водневі зв'язки між інгібітором та ферментом, а також тривалість їх існування протягом всього часу симуляції МД (100 нс) (табл. 1). Інгібітор SB-219383 формує дев'ять водневих зв'язків з амінокислотними залишками активного центру ферменту: Tyr36, Gly38, Asp40, His50, Asp178, Asp196, Gln197 (рис. 2). Тривалість існування водневих зв'язків коливається від 35 до 99% (див. табл. 1), що є свідченням конформаційної рухливості активного центру ферменту та інгібітора в розчині.

Інгібітор SB-219383 зв'язується в активному центрі ферменту, взаємодіючи з ділянкою зв'язування тирозину та фосфатної групи, його розміри менші за розміри тирозиладенілату, тому інгібітор не взаємодіє з каталітичною петлею (рис. 3). Ми припускаємо, що цим обумовлена низька специфічність інгібітора, що призводить до токсичності його для організму людини. В бактеріальних TyrRS мотив KMSKS відіграє важливу роль у каталітичному механізмі, тому інгібітори, які будуть взаємодіяти з цим мотивом, матимуть більшу афінність до бактеріальних TyrRS, ніж до еукаріотичних гомологів [15]. Ми проводимо по-

Таблиця 1. Водневі зв'язки між інгібітором SB-219383 та активним центром *Mt*TyrRS. Для кожного зв'язку наведено довжину та тривалість існування протягом 100 нс моделювання МД

Водневі зв'язки <i>Mt</i> TyrRS — SB-219383	Довжина, Å	Тривалість існування, %
Tyr36-OH — O13	2,89	37,72
Gly38-O — HO28	2,87	35,47
Asp40-NH — O1	2,61	91,82
His50-NE2H — O32	3,05	67,39
Asp178-OD2 — HO13	2,87	99,26
Asp196-OD1 — HO29	2,61	90,16
Asp196-OD2 — HO32	2,52	92,39
Gln197-OE1 — HO32	3,00	34,39
Gln197-NE2H — O32	2,92	50,47

шук нових селективних інгібіторів з врахуванням рухливості структури активного центру, використовуючи базу даних МД. Дизайн інгібіторів *Mt*TyrRS повинен базуватися на подібності до тирозиладенілату та динамічних фармакофорних ознаках, отриманих шляхом моделювання МД димеру *Mt*TyrRS у комплексах із субстратами та інгібітором SB-219383.

Таким чином, дослідження динамічних фармакофорних ознак інгібітора SB-219383 методом моделювання МД в комплексі з *Mt*TyrRS показало, що інгібітор утворює дев'ять водневих зв'язків, тривалість яких становить 39–99% загальної тривалості симуляції МД. Інгібітор зв'язується в активному центрі *Mt*TyrRS з ділянкою взаємодії тирозину та фосфатної групи, не заповнюючи кишеню зв'язування з аденіном та не взаємодіючи з каталітичною петлею. Нові інгібітори повинні взаємодіяти з каталітичним мотивом KFGKS, це надасть їм більшої афінності до бактеріальних TyrRS, ніж до еукаріотичних гомологів.

*Робота підтримана грантом № 15/2013 Державної цільової науково-технічної програми впровадження і застосування грид-технологій на 2009–2013 рр. та грантом № 49/2013 Програми наукових досліджень НАН України “Розробка інтелектуальних суперкомп'ютерних систем сімейства СКІТ, забезпечення їх ефективного функціонування та створення інформаційних технологій, сучасного математичного, програмно-технічного забезпечення для розв'язання складних та надскладних науково-практичних задач (Інтелект)” на 2013–2015 рр.*

1. Bedouelle H. Recognition of tRNA(Tyr) by tyrosyl-tRNA synthetase // *Biochimie*. – 1990. – **72**, No 8. – P. 589–598.
2. Одиноць К. О., Корнелюк О. І. Модель просторової структури тирозил-тРНК синтетази збудника туберкульозу *Mycobacterium tuberculosis* // *Укр. біохім. журн.* – 2008. – № 5. – С. 36–49.
3. Чекман І. С., Небесна Т. Ю., Казакова О. О., Сімонов П. В. Фармакофори: створення лікарських засобів // *Журн. АМН України*. – 2010. – **16**, № 3. – С. 424–437.
4. Stefanska A. L., Coates N. J., Mensah L. M. et al. SB-219383, a novel tyrosyl tRNA synthetase inhibitor from a *Micromonospora* sp. I. Fermentation, isolation and properties // *J. Antibiot. (Tokyo)*. – 2000. – **53**, No 4. – P. 345–350.
5. Houge-Frydrych C. S., Readshaw S. A., Bell D. J. SB – 219383, a novel tyrosyl tRNA synthetase inhibitor from a *Micromonospora* sp. II. Structure determination // *Ibid.* – 2000. – **53**, No 4. – P. 351–356.
6. Мукуляк В. В., Корнелюк О. І. Динамічне формування  $\beta$ -тяжової структури в активному центрі тирозил-тРНК синтетази еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* за даними молекулярної динаміки // *Доп. НАН України*. – 2012. – № 5. – С. 158–162.
7. Qiu X., Janson C. A., Smith W. W. et al. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* tyrosyl-tRNA synthetase in complex with a class of potent and specific inhibitors // *Protein Sci.* – 2001. – **10**, No 10. – P. 2008–2016.

8. Hess B., Kutzner C., Van Der Spoel D., Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation // J. Chem. Theory Comput. – 2008. – 4, No 3. – P. 435–447.
9. Hornak V., Abel R., Okur O. et al. Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters // Proteins. – 2006. – 65, No 3. – P. 712–725.
10. Bjelkmar P., Larsson P., Cuendet M. et al. Implementation of the CHARMM Force Field in GROMACS: Analysis of Protein Stability Effects from Correction Maps, Virtual Interaction Sites, and Water Models // J. Chem. Theory Comput. – 2010. – 6, No 2. – P. 459–466.
11. Salnikov A. O., Sliusar I. A., Sudakov O. O. et al. Virtual laboratory moldyngrid as a part of scientific infrastructure for biomolecular simulations // Int. J. Computing. – 2010. – 9, No 4. – P. 294–300.
12. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC.
13. Laskowski R. A., Swindells M. B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery // J. Chem. Inf. Model. – 2011. – 51. – P. 2778–2786.
14. Микуляк В. В., Корнелюк О. І. Конформаційна рухливість тирозил-тРНК синтетази еубактерії *M. tuberculosis* по даним комп'ютерного моделювання молекулярної динаміки // Фізика живого. – 2011. – 19, № 2. – С. 4–8.
15. Austin J., First E. Comparison of the catalytic roles played by the KMSKS motif in the human and *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetases // J. Biol. Chem. – 2002. – 277, No 32. – P. 28394–28399.

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

Надійшло до редакції 16.12.2013

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

### **Структура и динамика тирозил-тРНК синтетазы *Mycobacterium tuberculosis* в комплексе с ингибитором SB-219383**

*Ингибитор SB-219383 и его аналоги являются классом потенциальных ингибиторов бактериальных тирозил-тРНК синтетаз. Для исследования динамических фармакофорных признаков проведено моделирование молекулярной динамики тирозил-тРНК синтетазы эубактерии *Mycobacterium tuberculosis* в комплексе с ингибитором SB-219383. Показано, что ингибитор связывается в активном центре фермента, взаимодействуя с участком связывания тирозина и фосфатной группы. SB-219383 не взаимодействует с каталитической петлей KMSKS.*

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

### **Structure and dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase in complex with SB-219383 inhibitor**

*Inhibitor SB-219383 and its analogues are a class of potential inhibitors of bacterial tyrosyl-tRNA synthetases. To study the dynamic pharmacophore features, we have performed molecular dynamics simulations of *M. tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase in complex with SB-219383 inhibitor. The inhibitor binds to the active center of the enzyme interacting with the region of binding of tyrosine and a phosphate group. SB-219383 does not interact with the catalytic KMSKS loop.*