



УДК 577.32

<http://dx.doi.org/10.15407/dopovidi2016.01.099>

В. В. Микуляк<sup>1</sup>, І. С. Войтешенко<sup>2</sup>,  
член-кореспондент НАН України О. І. Корнелюк<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

<sup>2</sup>Інститут високих технологій Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, Київ

E-mail: v.mykuliak@imbg.org.ua

## Моделювання динаміки тирозил-тРНК синтетази *Mycobacterium tuberculosis* у комплексі з інгібітором SB-219383 з використанням QM/MM підходу

Тирозил-тРНК синтетаза *Mycobacterium tuberculosis* (*MtTyrRS*) – один із ключових ферментів синтезу білка на дорибосомному етапі, тому його інгібування є перспективним шляхом розробки нових антибіотиків. Ефективним та одним із найбільш досліджених інгібіторів *TyrRS* бактерій є сполука SB-219383. Авторами досліджено природу взаємодій між SB-219383 та *MtTyrRS* із застосуванням гібридного підходу молекулярної динаміки QM/MM. Особливу увагу приділено ідентифікації водневих зв'язків і дослідженню їхніх структурних та фізико-хімічних параметрів.

**Ключові слова:** *Mycobacterium tuberculosis*, тирозил-тРНК синтетаза, QM/MM підхід, інгібітор.

Тирозил-тРНК синтетаза еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* є ферментом I класу аміноацил-тРНК синтетаз, які каталізують приєднання амінокислоти до 3'-кінця відповідної тРНК<sup>Tyr</sup> на дорибосомному етапі синтезу білка [1]. Реакція аміноацилування проходить у два етапи. На першому етапі відбувається активація L-тироzinу за допомогою АТФ та утворюється проміжний продукт — тирозиладенілат. На другому етапі здійснюється перенесення L-тироzinу на тРНК<sup>Tyr</sup> і утворюється комплекс тирозил-тРНК<sup>Tyr</sup> [2]. Структура *MtTyrRS* містить характерні для I класу каталітичні мотиви HIGH та KMSKS. *MtTyrRS* значно відрізняється від структури цитоплазматичної *TyrRS* людини, яка має еукаріотичний тип доменної організації. Гомологія цих двох ферментів становить менше 20% [1]. Більш схожу до бактеріальних *TyrRS* структуру має мітохондріальна *TyrRS* людини [2], а її гомологія до *MtTyrRS* становить близько 42% [1].

© В. В. Микуляк, І. С. Войтешенко, О. І. Корнелюк, 2016

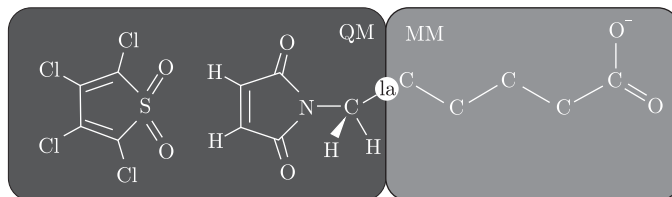


Рис. 1. Схематичне зображення системи для QM/MM розрахунків. Рисунок запозичено з роботи [Demchenko A. P., Yesylevsky S. O. Interfacial Behavior of Fluorescent Dyes // Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology III. — Berlin: Springer, 2011. — P. 3–62]

Ефективним та одним з найбільш досліджених інгібіторів TyrRS бактерій є сполука SB-219383 [3]. Раніше ми вже досліджували зв'язування цього інгібітора та субстратів в активному центрі *Mt*TyrRS, використовуючи метод молекулярної динаміки (МД) [4–6]. У силових полях молекулярної механіки (ММ) вплив електронів описано емпіричними параметрами, які визначено на основі експериментальних даних або на основі результатів, отриманих методами квантово-хімічних обчислень. У даній роботі ми аналізуємо взаємодії інгібітора SB-219383 з ферментом, досліджені за допомогою гібридного методу із застосуванням молекулярної механіки (ММ) та квантової механіки (QM/MM).

В обчисленнях гібридної динаміки методом QM/MM було застосовано програмні пакети Gromacs 5.0 [7] та Open 3.0 [8]. Динаміка обчислювалася методом ММ за допомогою силового поля AMBER99SB-ILDN [9], а у QM частині розрахунку було використано базовий набір 3–21G та рівень теорії DFT/ B3LYP. Підготовка систем для розрахунків динаміки була такою. Молекулу поміщали в бокс із водою, з мінімальною відстанню до стінки боксу 1 нм. Для нейтралізації сумарного заряду системи було додано іони  $\text{Na}^+$ . Було проведено 200 кроків мінімізації енергії системи методом крутого спуску. Урівноваження системи проводили, застосовуючи “стримування положень” (англ. position restraint) усіх важких атомів білка та інгібітора. Динаміку обчислювали, застосовуючи термодинамічний ансамбль NPT. Температуру і тиск підтримували при 310 K та 1 атм, використовуючи алгоритми V-rescale [10] та Parrinello–Rahman відповідно. Обмеження всіх ковалентних зв'язків проводили за допомогою алгоритму LINCS. Електростатичні взаємодії розраховували за допомогою алгоритму PME. Загальна тривалість розрахунку динаміки становила 0,8 пс.

Нами було підготовлено дві різні системи для QM/MM обчислень. В першій системі, лише інгібітор обчислювався методом QM, а білок — за допомогою ММ, в другій системі підсистема QM включала, крім інгібітора, також бокові групи взаємодіючих амінокислотних залишків активного центру. Інтерфейс між квантовою та молекулярною частинами системи є однією з найбільш складних проблем QM/MM розрахунків, особливо коли такі ділянки з'єднані ковалентно. Для цього в площині ковалентного зв'язку створюють так званий з'єднувальний атом (англ. link atom) (LA), який служить перехідною ланкою для QM та ММ розрахунків (рис. 1). З'єднувальний атом розглядається як атом гідрогену в QM підсистемі та як віртуальний сайт у ММ підсистемі QM/MM розрахунків.

Також гібридні QM/MM розрахунки, крім можливості знайти більш точну електронну енергію підсистеми та описати її геометричні характеристики, дають змогу визначити розподіл електронної густини QM частини системи, тобто отримати важливі дані про розподіл сил, що утримують цю частину у зв'язаному стані — “хімічних зв'язків”.

Основні поняття теорії атомів у молекулах Р. Бейдера запропоновані в роботі [12]. Так, згідно з моделлю Р. Бейдера [11–13], система подається як набір взаємодіючих атомів, при-

чому під останніми розуміють деякі області простору із чітко визначеними границями  $\Omega_i$ . Топологія електронної густини теорії аналізується за допомогою інструментарію векторного поля  $\vec{v} = \vec{\nabla}\rho(\vec{r})$  та градієнта густини електронного заряду  $\rho(\vec{r})$ . На основі властивостей поля електронної густини в критичній точці типу  $(3, -1)$ , яка лежить на відповідній лінії зв'язку між двома атомами, можна однозначно класифікувати за Бейдером тип взаємодії між цими атомами. Так, якщо у такій критичній точці  $\Delta\rho(\vec{r}_c) < 0$ , то взаємодія називається розподіленою [13]. До цього типу належить, наприклад, ковалентний зв'язок. Домінуючим внеском у енергію взаємодії в цьому випадку є внесок потенціальної енергії електронів. Електронна густина  $\rho$  у таких критичних точках також має порівняно велике значення —  $\sim 0,5$  а. о. Якщо ж у критичній точці  $\Delta\rho(\vec{r}_c) > 0$ , то кажуть, що має місце взаємодія заповненими оболонками [13]. До цього типу взаємодій належить, наприклад, водневий зв'язок. Домінуючий внесок у енергію взаємодії в цьому випадку здійснює кінетична енергія електронів. Електронна густина  $\rho$  у таких критичних точках має порівняно мале значення —  $\sim 0,05$  а. о.

У роботі [14] запропоновано спосіб оцінки енергії водневих зв'язків  $E_{\text{НВ}}$  за характеристиками розподілу  $\rho(\vec{r})$  електронної густини в критичній точці  $(3, -1)$ , що знаходиться на лінії зв'язку. За спостереженням авторів  $E_{\text{НВ}} = -D_e$ , де  $D_e$  — енергія дисоціації, пов'язана зі значенням віріалу  $V_{cp}$  в критичній точці  $\vec{r}_c$  таким чином:

$$E_{\text{НВ}} = \frac{1}{2}V_{cp},$$

причому  $E_{\text{НВ}}$  та  $V_{cp}$  виражені в атомних одиницях, а коефіцієнт  $1/2$  має зміст деякого ефективного об'єму.

Як вже зазначалося, значні перспективи у цьому напрямку відкриває можливість гібридних QM/MM розрахунків та відповідний детальний аналіз міжмолекулярних та внутрішньомолекулярних зв'язків на основі аналізу топології електронної густини.

Так, об'єкти, для детального дослідження та зв'язків у них, отримані з квантової частини QM/MM розрахунків, — відповідно інгібітор разом із з'єднувальними атомами, які є структурними містками до взаємодії із ферментом. Розрахунки QM частини проведені відповідно до теорії функціонала густини: хвильові функції розраховано методом DFT B3LYP/6-31 + G(d,p). Для пошуку, аналізу критичних точок типу  $(3, -1)$ , побудови та візуалізації молекулярного графа ми використовували програмний пакет AIMALL [15] зі стандартними опціями. Енергію водневих зв'язків  $E_{\text{НВ}}$  визначали за формулою Еспінози [14]. Усі графічні побудови та аналіз отриманих масивів даних виконано за допомогою авторських програмних розробок.

Нами було отримано траєкторії двох систем, різниця між якими полягає у відмінності поділу на QM та MM підсистеми. Першу систему було побудовано таким чином, що тільки інгібітор було віднесено до QM підсистеми, а активний центр та весь фермент — до MM підсистеми. У другій системі крім інгібітора до QM підсистеми було також включено взаємодіючі групи найближчих амінокислотних залишків активного центру (рис. 2).

Для порівняльного аналізу цих двох систем ми обчислили загальну кількість водневих зв'язків між інгібітором та MtTyrRS (рис. 3). Аналіз водневих зв'язків проводили, використовуючи стандартний інструмент програмного пакета Gromacs — hbond. Як видно на рис. 3, кількість водневих зв'язків зменшується в системі, де тільки інгібітор віднесено до QM підсистеми, тоді як у другій системі кількість водневих зв'язків збільшується. Тому для подальшого аналізу ми використовували систему, в якій підсистема QM включає інгібітор

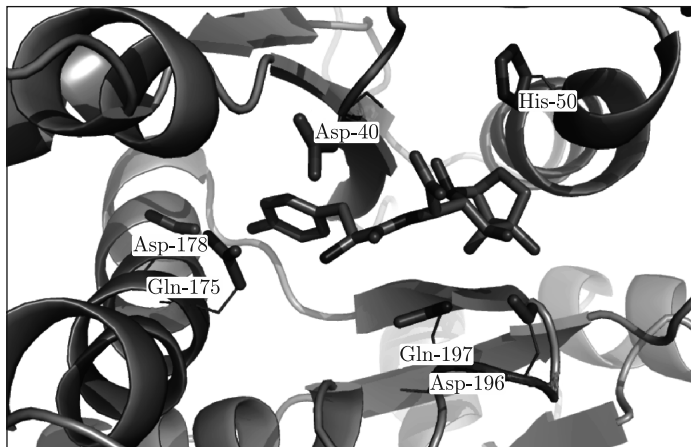


Рис. 2. Інгібітор SB-219383 в активному центрі *MtTyrRS* та хімічні групи амінокислотних залишків, які віднесено до QM підсистеми QM/MM обчислень

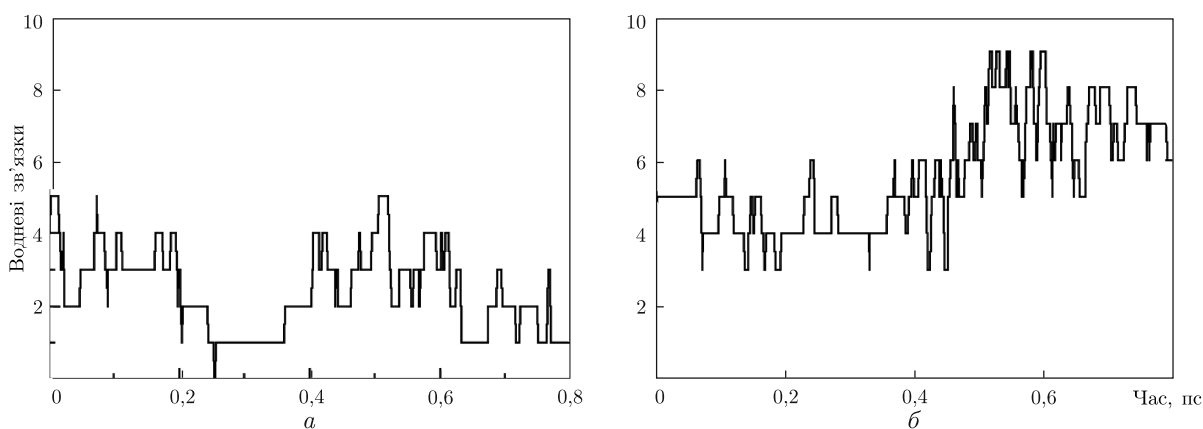


Рис. 3. Кількість водневих зв'язків між інгібітором SB-219383 та ферментом протягом динаміки QM/MM у системі, де тільки інгібітор було віднесено до QM підсистеми (а), та у системі, де QM підсистема включала також хімічні групи взаємодіючих залишків активного центру ферменту (б)

та хімічні групи взаємодіючих залишків активного центру ферменту, як більш стабільну з енергетичної точки зору.

Вперше на основі гібридного QM/MM методу розрахунків та додатково деталізованим квантово-хімічним дослідженням отримано картину взаємодій між SB-219383 та *MtTyrRS*. Особливу увагу приділено ідентифікації водневих зв'язків та дослідженню їхніх структурних та фізико-хімічних параметрів (енергії зв'язку, електронної густини в точці зв'язку тощо) (рис. 4, див. вклейку).

Одержані результати можуть бути корисними для експериментальної інтерпретації особливостей природи взаємодій між SB-219383 та *MtTyrRS* методами спектроскопії, а також для більш якісного шляху розробки нових антибіотиків описаних систем.

## Цитована література

1. *Одинець К. О., Корнелюк О. І.* Модель просторової структури тирозил-тРНК синтетази збудника туберкульозу *Mycobacterium tuberculosis* // Укр. біохім. журн. – 2008. – № 5. – С. 62–75.

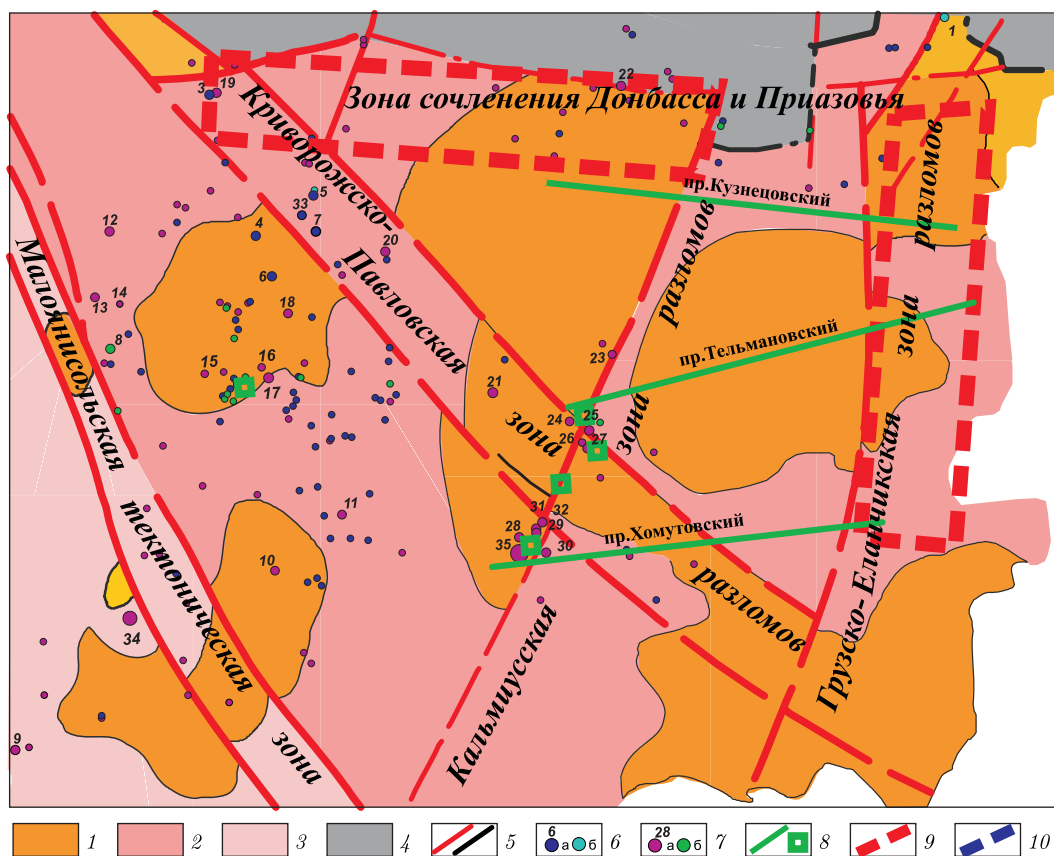


Рис. 1. Распределение редкометалльно-редкоземельного оруденения в пределах Восточного Приазовья.  
 Условные обозначения: 1 — сиениты, граносиениты, граниты; 2 — диориты, гранодиориты; 3 — гнейсы, кристаллосланцы; 4 — осадочные отложения; 5 — тектонические нарушения; 6, 7 — рудопроявления, их номера: 6 — бериллий (а), ниобий, тантал, цирконий (б), 7 — редкие земли (а), литий (б) (масштаб значка от большего к меньшему — месторождение, рудопроявление, аномалия); 8 — линия профиля и участки детальных исследований АМГЗ; 9 — проводящие объекты в недрах земной коры; 10 — отсутствие проводников

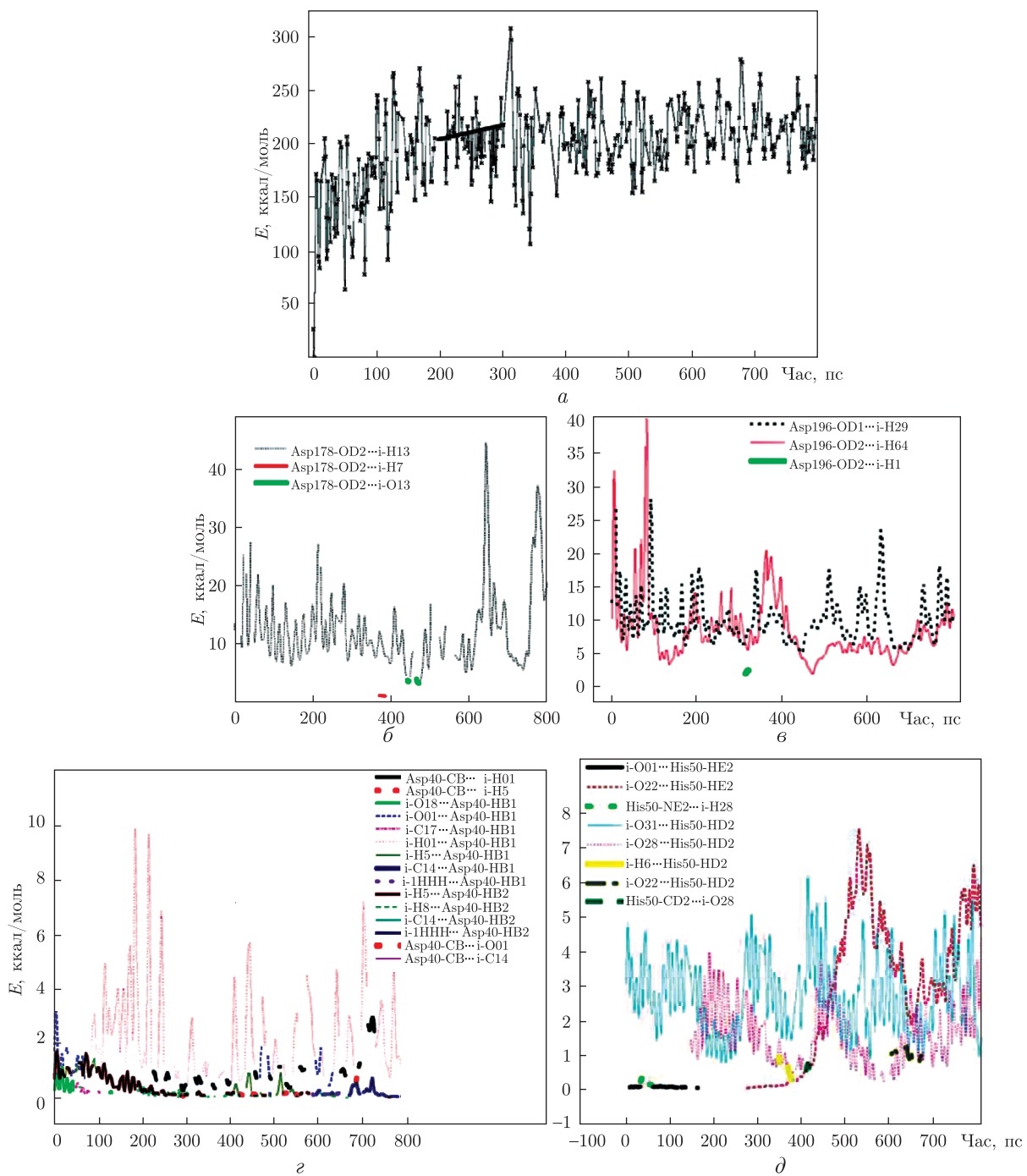


Рис. 4. Загальна електронна енергія QM частини системи із “з’єднувальними атомами” (а) та енергії деяких утворених водневих зв’язків між інгібітором SB-219383 та активним центром *MtTyrRS*: б–г — енергії водневих зв’язків для залишків Asp в активному центрі, які представлені найчисленнішою групою, д — наявні водневі зв’язки із залишком His50, який належить до каталітично важливого мотиву HIGH. Позначення атомів згідно з номенклатурою PDB, і — початок позначення атома інгібітора, що бере участь у зв’язку

2. Bonnefond L., Giegé R., Rudinger-Thirion J. Evolution of the tRNA<sup>Tyr</sup>/TyrRS aminoacylation systems // *Biochimie*. – 2005. – **87**, No 9–10. – P. 873–883.
3. Stefanska A. L., Coates N. J., Mensah L. M., Pope A. J., Ready S. J., Warr S. R. 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.
4. Mykuliak V. V., Kornelyuk A. I. The mechanisms of substrates interaction with the active site of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosyl tRNA synthetase studied by molecular dynamics simulations // *Biopolym. and cell*. – 2014. – **30**, No 2. – P. 157–162.
5. Мукуляк В. В., Корнелюк О. І. Структура і динаміка тирозил-тРНК синтетази *Mycobacterium tuberculosis* у комплексі з інгібітором SB-219383 // *Доп. НАН України*. – 2014. – № 6. – С. 156–159.
6. Мукуляк В. В., Дубей І. Я., Корнелюк О. І. Дизайн інгібіторів активного центру тирозил-тРНК синтетази *Mycobacterium tuberculosis* на основі інгібітора SB-219383 // *Доп. НАН України*. – 2014. – № 10. – С. 167–174.
7. Páll S., Abraham M. J., Kutzner C., Hess B., Lindahl E. Tackling exascale software challenges in molecular dynamics simulations with GROMACS // *Solving Software Challenges for Exascale*. – Cham, Switzerland: Springer, 2015. – P. 3–27.
8. Neese F. The ORCA program system // *WIREs Comput. Mol. Sci.* – 2012. – **2**, Iss. 1. – P. 73–78.
9. Hornak V., Abel R., Okur O., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters // *Proteins*. – 2006. – **65**, No 3. – P. 712–725.
10. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling // *J. Chem. Phys.* – 2007. – **126**. – 014101.
11. Бейдер Р. Атомы в молекулах. Квантовая теория. – Москва: Мир, 2001. – 536 с.
12. Bader R., Nguyen-Dang T. T., Tal Y. Quantum topology of molecular charge distributions. II. Molecular structure and its change // *J. Chem. Phys.* – 1979. – **70**, No 9. – P. 4316–4329.
13. Bader R. F. W., Essen H. The characterization of atomic interactions // *J. Chem. Phys.* – 1984. – **80**, No 5. – P. 1943. – 1960.
14. Espinosa E., Molinsa E., Lecomte C. Hydrogen bond strengths revealed by topological analyses of experimentally observed electron densities // *Chem. Phys. Lett.* – 1998. – **285**, No 3–4. – P. 170–173.
15. Keith T. A. AIMAll (Version 10.05.04). – 2010. – Resource access mode: <http://aim.tkgristmill.com>.

## References

1. Odynets K. A., Kornelyuk A. I. *Ukrain'skyi Biokhimichnyi Zhurnal*, 2008, **80**, No 5: 62–75 (in Ukrainian).
2. Bonnefond L., Giegé R., Rudinger-Thirion J. *Biochimie*, 2005, **87**, No 9-10: 873–883
3. Stefanska A. L., Coates N. J., Mensah L. M., Pope A. J., Ready S. J., Warr S. R. *J. Antibiot.* (Tokyo), 2000, **53**, No 4: 345–350.
4. Mykuliak V. V., Kornelyuk A. I. *Biopolym. and cell*, 2014, **30**, No 2: 157–162.
5. Mykuliak V. V., Kornelyuk A. I. *Dop. NAN Ukraine*, 2014, No 6: 156–159 (in Ukrainian).
6. Mykuliak V. V., Dubey I. Ya., Kornelyuk A. I. *Dop. NAN Ukraine*, 2014, No 10: 167–174 (in Ukrainian).
7. Páll S., Abraham M. J., Kutzner C., Hess B., Lindahl E. *Solving Software Challenges for Exascale*, Cham, Switzerland: Springer, 2015: 3–27.
8. Neese F. *WIREs Comput. Mol. Sci.*, 2012, **2**, Iss. 1: 73–78.
9. Hornak V., Abel R., Okur O., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. *Proteins*, 2006, **65**, No 3: 712–725.
10. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. *J. Chem. Phys.*, 2007, **126**: 014101.
11. Beider R. *Atoms in molecules. Quantum theory*, Moscow, Mir: 2001 (in Russian).
12. Bader R., Nguyen-Dang T. T., Tal Y. *J. Chem. Phys.*, 1979, **70**, No 9: 4316–4329.
13. Bader R. F. W., Essen H. *J. Chem. Phys.*, 1984, **80**, No 5: 1943–1960.
14. Espinosa E., Molinsa E., Lecomte C. *Chem. Phys. Lett.*, 1998, **285**, No 3–4: 170–173.
15. Keith T. A. AIMAll (Version 10.05.04). – 2010. – Resource access mode : <http://aim.tkgristmill.com>

Поступило в редакцію 14.09.2015

**В. В. Микуляк<sup>1</sup>, И. С. Войтешенко<sup>2</sup>,**  
член-корреспондент НАН Украины **А. И. Корнелюк<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

<sup>2</sup>Институт высоких технологий Киевского национального университета им. Тараса Шевченко, Киев

*E-mail:* v.mykuliak@imbg.org.ua

## **Моделирование динамики тирозил-тРНК синтетазы *Mycobacterium tuberculosis* в комплексе с ингибитором SB-219383 с использованием QM/MM подхода**

*Тирозил-тРНК синтетаза *Mycobacterium tuberculosis* (MtTyrRS) – один из ключевых ферментов синтеза белка на дорибосомном этапе, поэтому его ингибирование является перспективным путем разработки новых антибиотиков. Эффективным и одним из самых исследованных ингибиторов TyrRS бактерий является соединение SB-219383. Авторами исследована природа взаимодействий между SB-219383 и MtTyrRS с использованием гибридного подхода молекулярной динамики QM/MM. Особое внимание уделено идентификации водородных связей и исследованию их структурных и физико-химических параметров.*

**Ключевые слова:** *Mycobacterium tuberculosis*, тирозил-тРНК синтетаза, QM/MM подход, ингибитор.

**V. V. Mykuliak<sup>1</sup>, I. S. Voiteshenko<sup>2</sup>,**  
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **A. I. Kornelyuk<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, Kiev

<sup>2</sup>Institute of High Technologies, Taras Shevchenko National University of Kiev

*E-mail:* v.mykuliak@imbg.org.ua

## **MD simulations of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase in complex with SB-219383 inhibitor using QM/MM approach**

**Mycobacterium tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase (MtTyrRS) is one of the key enzymes at the pre-ribosomal step of protein synthesis. Therefore, its inhibition is a promising way for the development of new antibiotics. Effective and one of the most studied bacterial TyrRS inhibitors is SB-219383 compound. We have studied the nature of the interactions between SB-219383 and MtTyrRS using the hybrid approach of QM/MM simulations. In particular, a special attention has been paid to the identification of hydrogen bonds and their structural and physico-chemical parameters.*

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, tyrosyl-tRNA synthetase, QM/MM approach, inhibitor.