Микуляк Василь Васильович. Назва дисертаційної роботи: "Молекулярна динаміка тирозил-тРНК синтетази еубактерії Mycobacterium tuberculosis та формування метастабільних елементів в активному центрі"

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

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

Д И С Е Р Т А Ц І Я

на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Науковий керівник:

Корнелюк Олександр Іванович

доктор біологічних наук, професор,

член-кореспондент НАН України

Київ – 2015

2

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ ................... 5

ВСТУП ..................................................................................................................... 6

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ....................................................................... 12

1.1. Аміноацил-тРНК синтетази..................................................................... 12

1.1.1. Класифікація та структура аміноацил-тРНК синтетаз................... 12

1.1.2. Каталітичний механізм аміноацил-тРНК синтетаз ........................ 15

1.2. Структурно-функціональна характеристика тирозил-тРНК синтетаз 16

1.2.1. Структурні дослідження тирозил-тРНК синтетаз .......................... 17

1.2.2. Особливості каталітичного механізму тирозил-тРНК синтетаз ... 21

1.2.3. Відмінність структури MtTyrRS від TyrRS людини....................... 22

1.3. Інгібітори бактерійних TyrRS ................................................................. 24

1.4. Метод молекулярної динаміки у сучасній структурній біології......... 33

1.5. Раціональний дизайн інгібіторів ферментів .......................................... 35

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ....................................... 37

2.1. Моделювання просторової структури MtTyrRS та побудова

комплексів з субстратами................................................................................... 37

2.1.1. Просторова структура MtTyrRS у вільному стані .......................... 37

2.1.2. Отримання структури MtTyrRS у комплексі з L-тирозином......... 39

2.1.3. Отримання структури MtTyrRS у комплексі з L-тирозином та

АТФ…... ............................................................................................................. 39

2.1.4. Отримання структури MtTyrRS у комплексі з тирозиладенілатом.......................................................................................................... 40

2.1.5. Отримання структури MtTyrRS у комплексі з інгібітором

SB-219383… ...................................................................................................... 40

2.1.6. Модифікація інгібітора SB-219383 та побудова комплексів з

новими інгібіторами ......................................................................................... 40

2.2. Молекулярна динаміка............................................................................. 41

3

2.2.1. Параметри розрахунків динаміки..................................................... 42

2.2.2. Аналіз траєкторій динаміки MtTyrRS.............................................. 48

2.2.3. Підготовка топологій силового поля для субстратів та

інгібіторів........................................................................................................... 49

2.3. Обчислювальні ресурси............................................................................... 50

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ ............... 51

3.1. Просторова структура димеру MtTyrRS ................................................ 51

3.1.1. Моделювання повнорозмірної структури димеру MtTyrRS.......... 51

3.1.2. Просторове вирівнювання структури MtTyrRS з TyrRS інших

бактерій. ............................................................................................................. 55

3.2. Динаміка MtTyrRS у вільному стані....................................................... 57

3.2.1. Глобальна структурна стабільність MtTyrRS в ході динаміки...... 58

3.2.2. Динамічне формування антипаралельних β-шпильок у

неструктурованій каталітичній петлі.............................................................. 59

3.2.3. Структурні стани та динаміка неструктурованої каталітичної петлі

мутантної форми ............................................................................................... 63

3.2.4. Асиметричність структури димеру MtTyrRS в розчині................. 65

3.2.5. Особливості структури активного центру MtTyrRS....................... 68

3.3. Кореляція даних динаміки MtTyrRS з експериментальними даними. 72

3.3.1. Порівняння RMSF динаміки MtTyrRS та температурного фактора

кристалографічної структури MtTyrRS .......................................................... 73

3.3.2. β-структури у каталітичній петлі E. coli TyrRS у комплексі з

аналогом тирозил-аденілату ............................................................................ 74

3.4. Динаміка MtTyrRS у комплексах з різними субстратами .................... 76

3.4.1. Глобальна структурна стабільність MtTyrRS у комплексах з

субстратами в ході динаміки ........................................................................... 76

3.4.2. Динаміка MtTyrRS у комплексі з L-тирозином .............................. 77

3.4.3. Динаміка MtTyrRS у комплексі з АТФ............................................ 79

3.4.4. Динаміка MtTyrRS у комплексі з тирозил-аденілатом................... 80

4

3.4.5. Конформація каталітичної петлі KFGKS у комплексах з

субстратами ....................................................................................................... 82

3.5. Структура і динаміка активного центру димеру MtTyrRS у комплексі з

інгібітором SB-219383 та дизайн нових інгібіторів ........................................ 85

3.5.1. Загальна структурна стабільність..................................................... 85

3.5.2. Аналіз водневих зв’язків між активним центром та інгібітором.. 86

3.5.3. Особливості взаємодії інгібітора SB-219383 з активним центром

MtTyrRS.............................................................................................................. 87

3.5.4. Дизайн нових інгібіторів MtTyrRS на основі інгібітора

SB-219383 .......................................................................................................... 89

3.5.5. Динаміка MtTyrRS у комплексах з інгібіторам SB-219383 та

новими інгібіторами SB-219383-a і SB-219383-b .......................................... 90

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ..... 96

ВИСНОВКИ......................................................................................................... 110

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ........................................................... 112

5

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АРС – аміноацил-тРНК синтетаза

TyrRS – тирозил-тРНК синтетаза

MtTyrRS – тирозил-тРНК синтетаза еубактерії Mycobacterium tuberculosis

тРНК – транспортна РНК

Cα-атом – С-альфа атом

RMSD – середньоквадратичні відхилення (англ. root mean square deviation)

RMSF – середньоквадратичні флуктуації (англ. root mean square fluctuation)

МД – молекулярна динаміка

АТФ – аденозинтрифосфат

АМФ – аденозинмонофосфат

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ФФ – пірофосфат

АА – амінокислота

Å – ангстрем

нм – нанометр

нс – наносекунда

пс – пікосекунда

фс – фемтосекунда

мкМ – мікромоль

нМ – наномоль

мкг/мл – мікрограм на мілілітр

PDB – Protein Data Bank

PME – Particle Mesh Ewald

DSSP – Dictionary of Secondary Structure of Protein

IC50 – концентрація напівмаксимального інгібування

MIC50 – мінімальна інгібувальна концентрація

MMFF – молекулярне силове поле Merck (англ. Merck Molecular Force Field)

Н-зв’язок – водневий зв’язок

6

ВСТУП

Актуальність теми. У зв’язку з появою нових резистентних штамів

еубактерії Mycobacterium tuberculosis існує потреба в розробці нових

антибактерійних інгібіторів [1, 2]. Аміноацил-тРНК синтетази розглядають

як перспективні мішені для розробки нових антибактерійних

інгібіторів [3, 4]. 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-тирозину до гомологічної йому

тРНК [5]. Реакція є АТФ-залежною і відбувається у два етапи. На першому

етапі з ферментом зв’язується L-тирозин та ATФ і утворюється проміжний

продукт реакції естерифікації тирозил-аденілат та вивільнюється пірофосфат.

На другому етапі з MtTyrRS зв’язується гомологічна тРНКTyr та відбувається

ковалентне приєднання до неї L-тирозину, після чого від ферменту дисоціює

навантажена амінокислотою тирозил-тРНКTyr та АМФ [6, 7].

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% [8]. Важливо

відмітити, що TyrRS прокаріотного і евкаріотного типів не здатні до

перехресного розпізнавання та аміноацилювання відповідних тРНКTyr [9].

Структури тирозил-тРНК синтетаз деяких бактерій досліджували

протягом останніх років методом рентгеноструктурного аналізу. Однак цей

7

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 [10], прегнан-Х-рецептора [11] 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

8

бюджетної теми “Дослідження локальних конформаційних змін та

формування метастабільних структурних елементів в тирозил-тРНК

синтетазах прокаріотів 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 тирозилтРНК 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 KMSKS-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

9

TyrRS у розчині та структурно-функціонального стану каталітичної KMSKSпетлі АРСаз І-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 АРСаз Іго 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 водноіонному 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-аденілатом

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;

10

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 [12-17], 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 [18-29].

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

11

викладено на 135 сторінках стандартного машинопису, вона містить 40

рисунків та 14 таблиць.

ВИСНОВКИ

ПроведенодослідженнямолекулярноїдинамікитирозилтРНК

синтетазиувільномустанітавкомплексахзсубстратамитирозиноміАТФтапроміжнимпродуктомреакціїтирозиладенілатом

Виявленоформуванняметастабільнихβшпильоквкаталітичнійпетліферментуякістабілізуютькаталітичнупетлюуфункціональному

стані

ПоказанощохарактернадляАРСазкласуІкаталітичнапетлядинамічноформуєдвіантипаралельніметастабільні

βшпилькинабоковихчастинахпетлітривалістьіснуванняякихскладає–

пс

Впершепоказанощоантипаралельніβшпилькиякіформуються

вкаталітичнійпетліпідтримуютьпетлюузакритійМподібнійконформації

спрямовуючикаталітичниймотив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Оподібнийстан

ВстановленощоСкінцевідоменидимеруякі

проявляютьвисокурухливістьрухаютьсяскорельованоНаближенняСкінцевогодоменудокаталітичногодоменувсубодиниціАсупроводжується

віддаленнямСкінцевогодоменувідкаталітичногодоменувсубодиниціБ

ТакіскорельованірухиСкінцевихдоменівпризводятьдоформування

асиметричноїструктуриферментуурозчині

Мподібнаконформаціякаталітичноїпетлізалежитьвід

субстратувактивномуцентріКаталітичнапетляприймаєтрирізнізакриті

конформаціїзакритуконформаціюувільномустані

конформацію

петліпринаявностівактивномуцентріАТФ

тапринаявності

зв’язаноготирозиладенілату





Запропонованоновідвоцентровіінгібітори

таякізв’язуютьсязАТФзв’язуючимцентромікаталітичним

мотивомтамаютьнижчіенергіївзаємодійзферментомзавідомий

інгібітор