

## КОМП'ЮТЕРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДИНАМІКИ МУТАНТНОЇ ФОРМИ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ G41R, АСОЦІЙОВАНОЇ З НЕЙРОПАТІЄЮ ШАРКО-МАРІ-ТУСА

О. В. САВИЦЬКИЙ, О. І. КОРНЕЛЮК

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;  
e-mail: [savytskyi@moldyngrid.org](mailto:savytskyi@moldyngrid.org)

Побудована комп'ютерна модель просторової структури мутантної форми G41R тирозил-тРНК синтетази людини (HsTyrRS), структурні координати якої не визначені експериментально. Проведено комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки HsTyrRS в інтервалі 100 нс та вивчено вплив мутації G41R, асоційованої з нейропатією Шарко-Марі-Туса, на локальні конформаційні зміни ензиму. Для розрахунків молекулярної динаміки використано ґрід-сервіси віртуальної лабораторії MolDunGrid та обчислювальні ресурси Української національної ґрід-інфраструктури. Методом молекулярної динаміки показано формування антипаралельної  $\beta$ -шпильки у неструктурованій ділянці між спіралями H9 і H10 у мутантній формі G41R (CPI-вставка згортки Россмана) за участю амінокислотних залишків Lys147 – Glu157.

**Ключові слова:** мутантна форма тирозил-тРНК синтетази (HsTyrRS), нейропатія Шарко-Марі-Туса (ШМТ), G41R, ґрід, MolDunGrid, CPI-вставка, молекулярна динаміка, комп'ютерне моделювання.

Основною функцією аміноацил-тРНК синтетаз (АРСаз) є каталіз високоспецифічного приєднання L-амінокислот до гомологічних тРНК, проте в останні роки відкрито та інтенсивно вивчаються неканонічні функції АРСаз. Встановлено зв'язки між нейродегенеративними захворюваннями та мутаціями в генах, які кодують цитоплазматичні АРСази. Так, наприклад, показано, що п'ять незалежних мутацій в гені гліцил-тРНК синтетази (GlyRS) асоційовані із сенсомоторною дистальною аксональною нейропатією Шарко-Марі-Туса (ШМТ) типу 2D [1–5]. Функціональний аналіз мутантних форм GlyRS показав відсутність істотних змін в рівнях експресії протеїну, а також те, що у більшості випадків вони локалізовані в нейронах. Аналіз аміноацилювання семи мутантних GlyRS показав, що чотири мутації (E71G, P234KY, D500N та S581L) не впливають на активність ензиму, тоді як інші три (L129P, G240R і G526R) призводять до його інактивації [5].

Для цитоплазматичної тирозил-тРНК синтетази (TyrRS) також ідентифіковано зв'язок із нейродегенеративними захворюваннями. Три

незалежні мутації гена TyrRS є причинами нейропатії ШМТ типу С [6, 7]. Серед синтетаз з іншою специфічністю показано, зокрема, зв'язок синтетази, специфічної для аланіну, із загибеллю клітин Пуркіне та атаксією [8, 9]. Це свідчить, що ензими аміноацилювання тРНК, крім виконання своєї канонічної функції, також відіграють істотну роль у підтримці функцій периферійних аксонів.

Нейропатії ШМТ – це група спадкових, генетично гетерогенних захворювань периферійної нервової системи, які обумовлені демієлінізацією або дегенерацією аксонів, або комбінацією обох цих причин [10]. Нейропатії ШМТ є одними з найпоширеніших груп моногенних нейром'язових захворювань, що зустрічаються із частотою 1:2500 (2–4 хворих на 10 000). Обидві основні форми ШМТ (демієлінізуюча і аксональна) можуть успадковуватися за автосомно-домінантним, автосомно-рецесивним, X-зчепленим типами наслідування, а також зустрічаються мутації *de novo*.

Найчастішою (мажорною) домінантною мутацією ШМТ (68–90% ШМТ1) є дуплікація фрагмента 1,4 тисяч п.н. (пар нуклеотидів) у

локусі 17p11.2-12 хромосоми 17, яка виникає внаслідок нерівного кросинговеру гомологічних хромосом у мейозі і призводить до розвитку ШМТ демієлінового типу 1А (ШМТ1А) [11]. Клінічні ознаки захворювання в більшості хворих зумовлені надекспресією гена *PMP22* місліну та наявністю трьох або чотирьох копій цього гена. Ще приблизно 10–20% випадків захворювання пов'язано з Х-зчепленими мутаціями в гені коннексину-32 (*Cx32*, *GJb1*) в локусі *Xq13.1*.

**Нейропатія DI-ШМТСі *TyrRS*.** Автосомно-домінантна проміжна форма нейропатії ШМТ типу С (DI-ШМТС, OMIM 608323) є генетичним і фенотипічним варіантом класичної ШМТ, яка характеризується проміжною швидкістю нервової провідності та гістологічними ознаками як дегенерації, так і демієлінізації аксонів. Ідентифіковано локус 1p34-p35 хромосоми 1, пов'язаний з DI-ШМТС, який відповідає гену *YARS* (GeneID: 8565), що кодує *TyrRS* [6, 7].

*TyrRS* локалізується в кінчиках аксонів у культурах диференціюючих первинних моторних нейронів і нейробластом. Цей специфічний розподіл істотно зменшується в клітинах, які експресують зазначені мутантні форми *TyrRS* [7]. Біохімічні експерименти і генетична комплементация в дріжджах показали часткову втрату аміноацилюючої активності цих мутантних протеїнів, а також те, що мутації в ортологічному гені *TYS1* дріжджів зменшують швидкість росту дріжджів. На сьогодні ідентифіковано дві гетерозиготні місенс-мутації і одну делецію *de novo* в *TyrRS* у трьох незалежних родинах із DI-ШМТС [7]. Так, у родині з Північної Америки ідентифіковано гетерозиготну транзицію 121G→A в екзоні 2 гена *YARS*, яка спричиняє місенс-мутацію Gly41Arg (мутація ШМТ-160). У родині з Болгарії знайдено гетерозиготну транзицію 586G→A в екзоні 5 цього гена, яка призводить до мутації Glu196Lys (мутація ШМТ-176). Крім того, у хворій пацієнтки з Бельгії, ідентифіковано делецію 458-469del12 розміром 12 п.н. в рамці трансляції екзона 4, яка призводить до делеції 153-156delVKQV (делеція PN-765) (рис. 1).

Відомо, що мутантні форми: G41R і делеція 153-156delVKQV показують значне зниження здатності зв'язування L-тироzinу більш ніж у 100 разів [12]. Аналогічно G41R, мутація G526R в активному центрі *GlyRS* призводить до блокування зв'язування субстратного AMP

[13]. У той самий час, мутантна форма E196K *TyrRS* суттєво не впливає на кінетику формування проміжного продукту тирозил-аденилату і фактично підвищує швидкість передачі тирозину до тРНК<sup>Tyr</sup>. Авторами висунуто припущення, що порушення каталітичних властивостей не є спільним для всіх мутантних форм, асоційованих з нейропатією ШМТ [12].

Нами висловлено гіпотезу, що молекулярним механізмом реалізації мутацій в APCазах за нейродегенеративних захворювань є конформаційні зміни ензимів, які призводять до порушення нормальних протеїн–протеїнових взаємодій в макромолекулярних комплексах. Метою цієї роботи є комп'ютерне моделювання конформаційної динаміки мутантної форми тирозил-тРНК синтетази людини G41R та пошук локальних конформаційних змін ензиму внаслідок мутації. Дослідження структурних властивостей і динаміки *TyrRS* має важливе значення з точки зору як фундаментальних знань механізму функціонування цього ензиму, так і практичного використання одержаних результатів для розробки нових біомедичних препаратів.

## Матеріали і методи

### Комп'ютерне моделювання *TyrRS*.

В роботі проведено комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки мутантної форми *TyrRS* G41R у часовому діапазоні до 100 нс. Для проведення досліджень методом молекулярної динаміки необхідні потужні обчислювальні ресурси, тому було залучено грид-ресурси Українського національного гриду [16], причому одним із таких ресурсних центрів є обчислювальний кластер Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. За технічної підтримки кластеру ІМБГ створено віртуальну лабораторію MolDynGrid (<http://moldyngrid.org>) для вирішення завдань у галузях структурної біології і біоінформатики [17–19], які потребують значних витрат машинного часу та оперують великими об'ємами інформації [20]. Віртуальна лабораторія входить до складу Української національної грид-інфраструктури (<http://ung.in.ua/>) [21] як віртуальна організація MolDynGrid (VO: moldyngrid), що обслуговується сервером VOMS під керуванням PHP VOMS-Admin (<http://voms.grid.org.ua/voms/>). З 2011 року VO: moldyngrid офіційно зареєстрована як части-

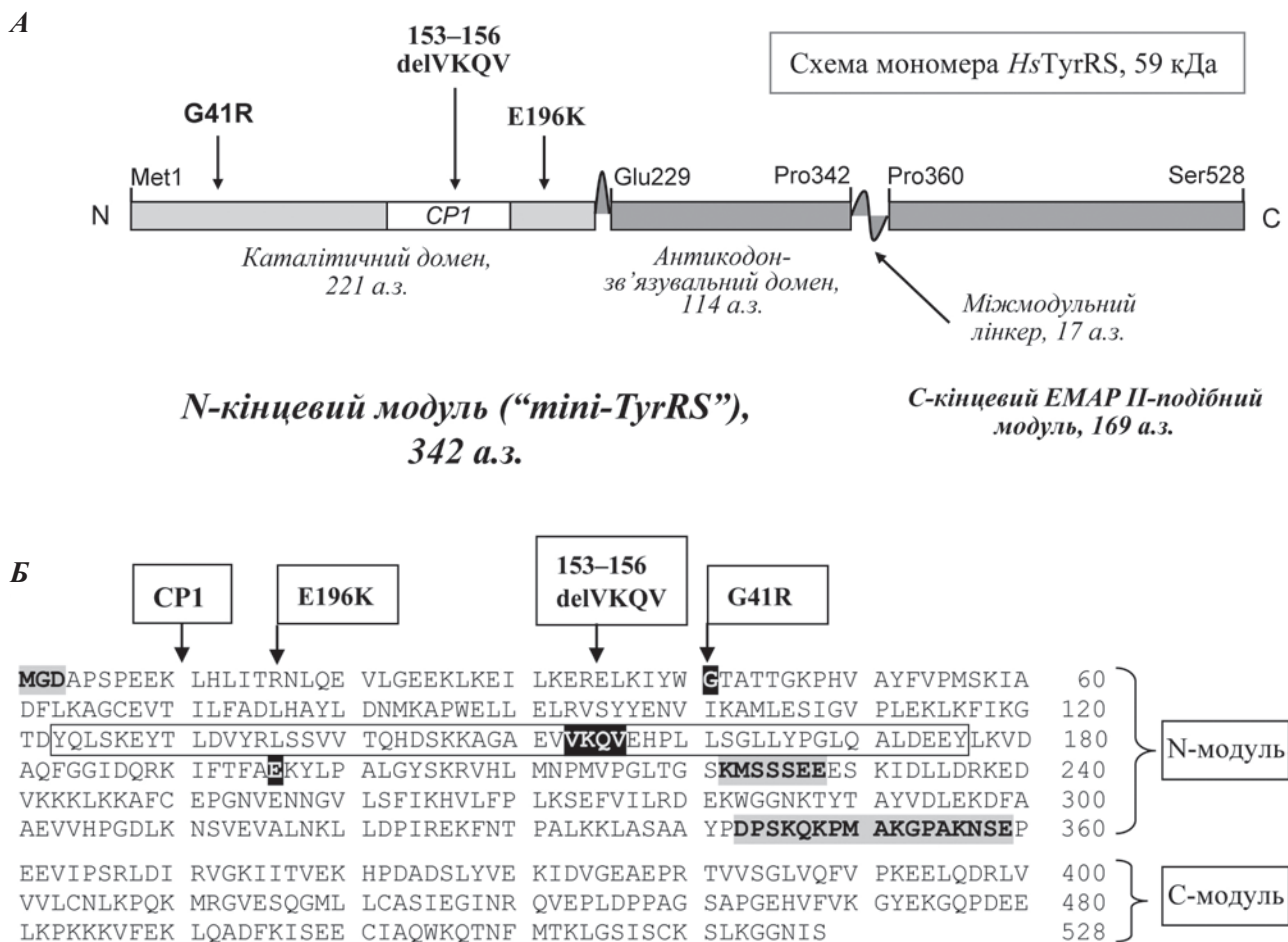


Рис. 1. Положення двох точкових мутацій G41R, E196K та делеції 153-156delVKQV в цитоплазматичній *HsTyrRS* [6, 7, 14]. А – схема доменної організації субодиноці *HsTyrRS* (N-модуль має аміноацилюючу активність, а С-модуль є гомологічним до цитокіну ЕМАР II). Б – амінокислотна послідовність субодиноці *TyrRS* (GenPept код NP\_003671); залишки пов'язані з DI-ШМТС виділено чорним кольором, ділянки для яких не встановлено атомних координат, у кристалографічних структурах (PDB коди: 1N3L, 1Q11, 1NTG), виділено сірим кольором. Послідовність, яка належить до CP1-вставки [15] виділено рамкою чорного кольору

на Європейській грид-інфраструктурі (European Grid Infrastructure, <https://www.egi.eu>).

Пошук гомологічних послідовностей проводили з використанням програм і баз даних сервера BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Послідовності протеїнів взято з банку даних GenPept сервера NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Множинне вирівнювання послідовностей проводили з використанням сервера Clustal W (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>). Для одержання повнорозмірної структури *HsTyrRS* проведено комп'ютерне моделювання *in silico* з використанням пакета програм Modeller 9.7. Структурними ша-

блонами N- і С-кінцевих модулів слугували кристалографічні структури *HsTyrRS*, які депоновано в базі даних Protein Data Bank (PDB): 1N3L:A (ділянка А3–Р342), 1NTG:A (ділянка Р360–S528). Амінокислотні залишки N-кінця синтетази (M1–D3), каталітичної петлі (K222–E228) і міжмодульного лінкера (D343–E359), які мають підвищену рухливість та не мають визначених координат в обох структурних шаблонах, змодельовані в Modeller 9.7, як петлеві структури. Моделювання лінкера довжиною 17 амінокислотних залишків (а.з.) було досить проблематичним, тому побудову виконано на базі матриці автокаталітичної тирозинової

C-Abl кінази людини (IOPL:A, T231-M256). Моделювання мономерів, складених за прикладом протоколу «Homology modeling with multiple templates», включало зміни значень параметрів (a.library\_schedule, a.max\_var\_iterations, a.md\_level), з пошуком найоптимальніших рішень для побудови кращої структурної моделі. Отримано 500 структур з 5 ансамблів по 100 структур у кожному. Характеристику змодельованих структур відсортовано одночасно за трьома критеріями: Modeller Objective Function (molpdf), Discrete Optimized Protein Energy (DOPE), Normalized DOPE score. Тому було обрано структуру за найкращими сумарними оціночними показниками (Mol\_pct\_rank: 92,00) веб-сервера MolProbity 3 – <http://molprobity.biochem.duke.edu/>.

Побудову димеру повнорозмірної HsTyrRS виконано з використанням програмного пакета Swiss-PDB Viewer 4.0 (<http://www.expasy.ch/spdbv/mainpage.html>) методом суперпозиції на кристалографічну структуру біологічної одиниці 1N3L без порушень водневих зв'язків в інтерфейсі димеризації [22, 23]. Точкову мутацію G41R проведено для повнорозмірної конформації димеру в програмному пакеті Modeller 9.7 з використанням відповідного алгоритму (mutate\_model.py) для двох амінокислотних залишків (по одному в кожному з мономерів) без зміни координат інших атомів структури. У цьому дослідженні ми використовували структуру міні-TyrRS людини (2x39 кДа), тому C-кінцевий домен та лінкер у програмному пакеті Swiss-PdbViewer 4.0 було видалено.

**Методика розрахунків молекулярної динаміки.** Для розрахунку молекулярної динаміки використовували версію пакета програм GROMACS 4.0.7 [24]. Загальна схема розрахунку полягала в наступному. Координати структур досліджуваних протеїнів конвертували з pdb формату у внутрішній формат GROMACS - gro. При цьому наявні атоми водню видалялися з pdb структури і потім додавалися знову у файл формату gro. Цю процедуру проводили для створення коректної топології. В усіх розрахунках використовували силове поле GROMOS 53a6 [25]. Структуру розміщували в боксі, який має форму зрізаного октаедра з мінімальною відстанню від стінок боксу до атомів протеїну 1 нм. Далі проводили мінімізацію енергії системи протягом 200 кроків методом крутого спуску. Після цього бокс заповнювали SPC216 (Single Point Charge)

моделлю води. Програму *genion* використано для забезпечення іонної сили 150 мМ за рахунок додавання  $K^+$  і  $Cl^-$  у систему. Мінімізацію енергії проводили методом крутого спуску (steep), після чого було використано метод спряженого градієнта (cg).

На наступному етапі розраховували молекулярну динаміку з гармонійною прив'язкою атомів протеїну до їхніх вихідних координат протягом 50 пс (результуючу систему вводили як вихідну). Інтегрування здійснювалося з кроком у 4 фс за допомогою методу позмінного випередження, еквівалентного алгоритмові Верлета. Координати атомів записувалися у файл із періодичністю 1 пс. Довжину зв'язків підтримували постійною за допомогою алгоритму SHAKE. Електростатичну взаємодію враховували за методом PME (Particle-Mesh Ewald sum). Параметр відсічення (cutoff) було виставлено в 1 нм для всіх типів взаємодій. Температуру системи (310 K) і тиск (1 атм) підтримували постійно.

Конвертацію траєкторій виконували за допомогою програми *trjconv*. Середньоквадратичні відхилення Ca атомів від їхніх вихідних позицій розраховували за допомогою програм *g\_rms* та *g\_rmsf*. Проведено аналіз залежності зміни вторинної структури від часу і для побудовання матриці використано програму *do\_dssp*. Програми Visual Molecular Dynamics (VMD 1.9.1) [26] і PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5 Schrödinger, LLC використано для аналізу і візуалізації траєкторій та окремих фреймів молекулярної динаміки. Автоматизацію аналізу виконано з використанням DAS 1.0 (Distributed Analyzer Script) [27, 28].

**Обчислювальні ресурси.** Комп'ютерне моделювання просторової структури проводили на обчислювальному кластері ІМБГ НАН України. Кластер ІМБГ НАН України (<http://grid.imbg.org.ua/>) функціонує під керуванням операційної системи Scientific Linux 6 x86\_64, на якому інстальовано необхідне програмне забезпечення. Комп'ютерні розрахунки молекулярної динаміки проводили в Українській національній грид-інфраструктурі (<http://ung.in.ua/>) з використанням сервісів віртуальної лабораторії MolDynGrid (<http://moldyngrid.org/>). До MolDynGrid під'єднано 8 ресурсних центрів загальною кількістю ~2500 процесорних ядер: 1 – ISMA (ICMA) – Інститут сцинтиляційних



матеріалів НАНУ; 2 – КНУ (КНУ) – Київський національний університет імені Тараса Шевченка; 3 – IFBG (ІХБГ; ІКБГІ) – Інститут харчової біотехнології та геноміки НАНУ; 4 – ІМВГ (ІМБГ) – Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ; 5 – МАО (ГАО) – Головна астрономічна обсерваторія НАНУ; 6 – КРІ (КПІ) – Київський політехнічний інститут; 7 – ІСҮВ (ІК) – Інститут кібернетики імені В. М. Глушкова НАНУ; 8 – LRZ Linux Cluster (EG1) – обчислювальний центр імені Лейбніца при Академії наук Баварії.

### Результати та обговорення

В активному центрі TyrRS амінокислотний залишок Gly41 локалізований на кінці  $\beta$ -тяжа A1 та належить до найбільш еволюційно-консервативних для TyrRS. Внаслідок мутації G41R аргінін має набагато більший об'єм, ніж гліцин, до того ж його гуанідинова група є позитивно зарядженою. Тому досить несподіваним є те, що мутація Gly41Arg взагалі сумісна зі стабільною структурою TyrRS. У радіусі 0,5 нм від амінокислотного залишку Gly41 знаходяться атоми шести залишків (зокрема, 39-YW, 42-

TA, L72 і F183), з якими Gly41 не утворює водневих зв'язків, проте Leu72 утворює водневі зв'язки з остовом сусідніх залишків у  $\beta$ -шарі. В радіусі 0,7 нм від Gly41 знаходиться 17 переважно гідрофобних залишків, з яких п'ять є ароматичними. Залишок Gly41 розташований в кишені, яка сформована насамперед залишками W40, T42, A43 і Q188 та має досить значну доступну для розчинника поверхню. Заміна залишку Gly41 на аргінін (рис. 2) показала, що в радіусі 0,5 нм від залишку Arg41 знаходяться 11 амінокислотних залишків: 39-YW, 42-TA, L72, A74, Y166, Q170, 182-QF, Q188.

Для всіх структур виконано стадії мінімізації та врівноваження макромолекул протеїну з молекулами розчинника та іонами. Завдяки проведеним розрахункам одержано траєкторії молекулярної динаміки mini-TyrRS людини та її мутантної форми G41R (100 нс кожна). Аналіз середньоквадратичних відхилень C $\alpha$  атомів (RMSD, Root-Mean-Square Deviation) свідчить про стабільність всіх траєкторій в процесі динаміки з відхиленням 0,4 та 0,55 нм для траєкторії ензиму дикого типу і мутантної форми G41R відповідно. Значення середньо-

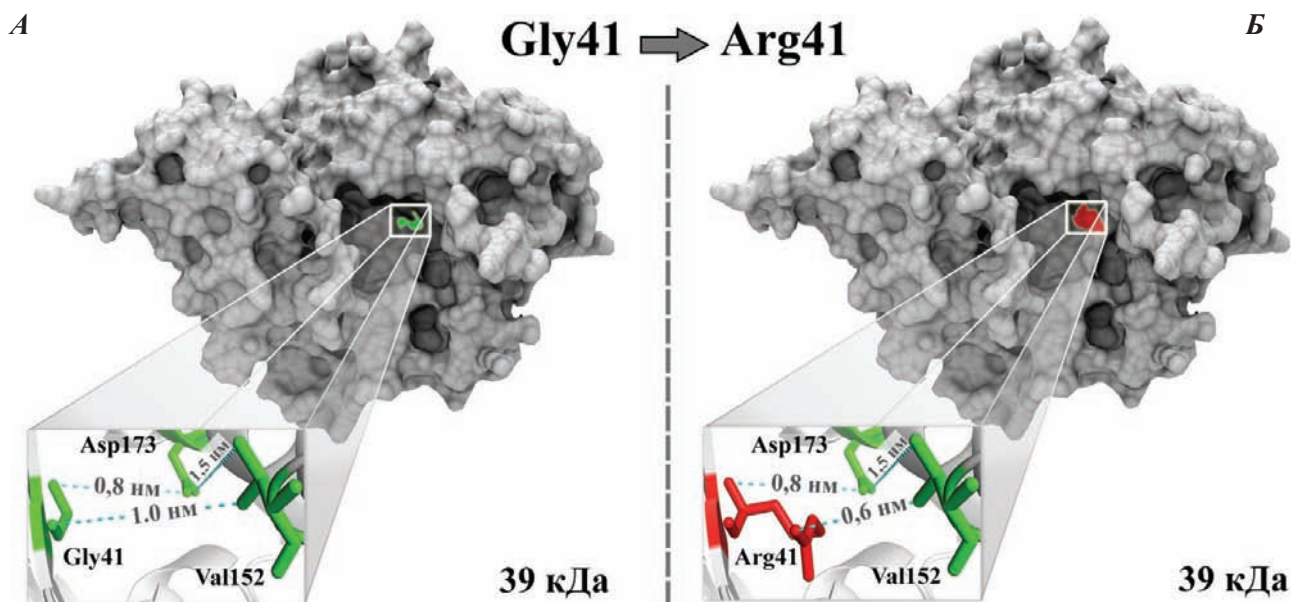


Рис. 2. Комп'ютерний мутагенез G41R TyrRS. Заміна залишку Gly41 на аргінін, який є локалізованим на кінці  $\beta$ -тяжа A1 і належить до еволюційно найконсервативніших для TyrRS. А – локалізація сайту мутації, від якого в радіусі 0,5 нм знаходяться атоми шести амінокислотних залишків (зокрема, 39-YW, 42-TA, L72 і F183). Б – сайт мутації для мутантної форми G41R TyrRS, від якого в радіусі 0,5 нм знаходяться 11 амінокислотних залишків: 39-YW, 42-TA, L72, A74, Y166, Q170, 182-QF, Q188. Комп'ютерний мутагенез проведено з використанням програми Modeller 9.7

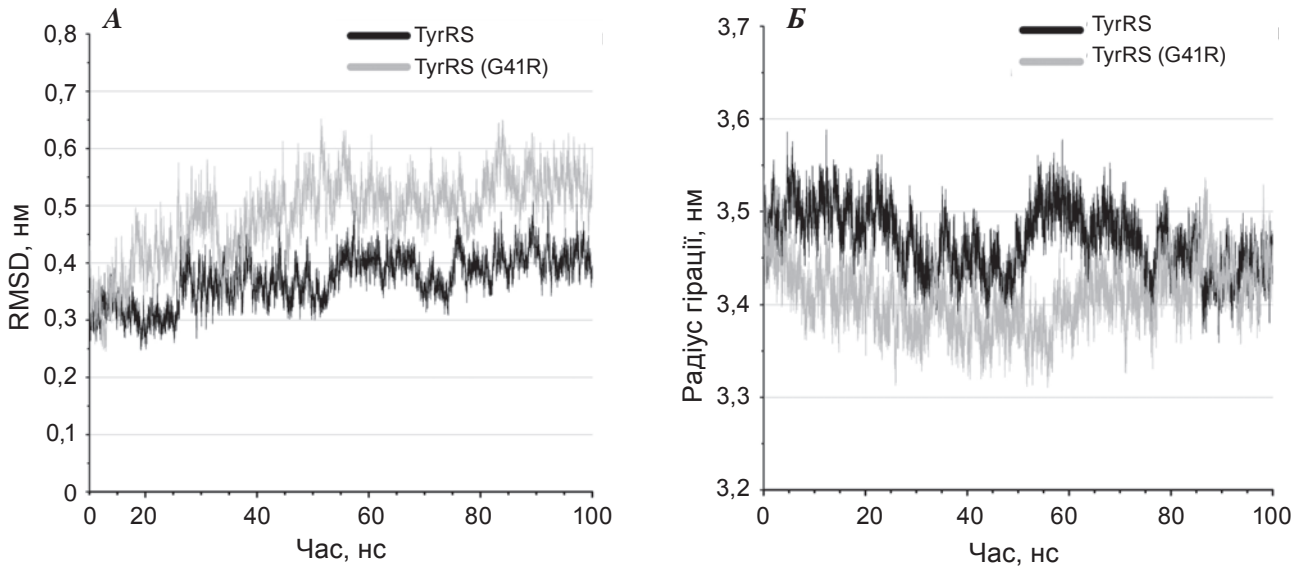


Рис. 3. А – середньоквадратичні відхилення RMSD (Root-Mean-Square Deviation) Ca атомів, які свідчать про стабільність траєкторій молекулярної динаміки. Періоду релаксації відповідають перші 40–60 нс. Б – радіус гірації TyrRS та її мутантної форми G41R у часовому інтервалі 100 нс

квадратичного відхилення – менше в декілька разів відносно повнорозмірної структури ензиму (2x59 кДа) за рахунок відсутності лінкера та С-модуля [23]. Періоду релаксації відповідають перші 40–60 нс, що враховано в подальшому аналізі траєкторій (рис. 3, А).

Для характеристики компактності макромолекули синтетази у процесі динаміки досліджено зміни радіуса гірації протеїну (рис. 3, Б). Найбільшу амплітуду мають перші 60 нс молекулярної динаміки від 3,3 до 3,6 нм. Для мутантної форми G41R спостерігається зменшення значення радіуса гірації до 3,3 нм, яке супроводжується більш плавним переходом. Зміни компактності молекули можуть бути наслідком специфічних рухів між каталітичним та антикодонзв'язувальним доменами.

Для аналізу рухливості окремих ділянок протеїну розраховано середньоквадратичні флуктуації (RMSF, Root-Mean-Square Fluctuations) окремих атомів. Результати аналізу вказують на виражену асиметрію рухливості мономерів (рис. 4). Найбільші значення відхилень виявлено для амінокислотних залишків неструктурованої каталітичної петлі синтетази, яка містить KMSKS-подібний каталітичний мотив в *HsTyrRS* – KMSSS, та антикодонзв'язувального сайту. Для мутанта G41R середньоквадратичні відхилення а.з.

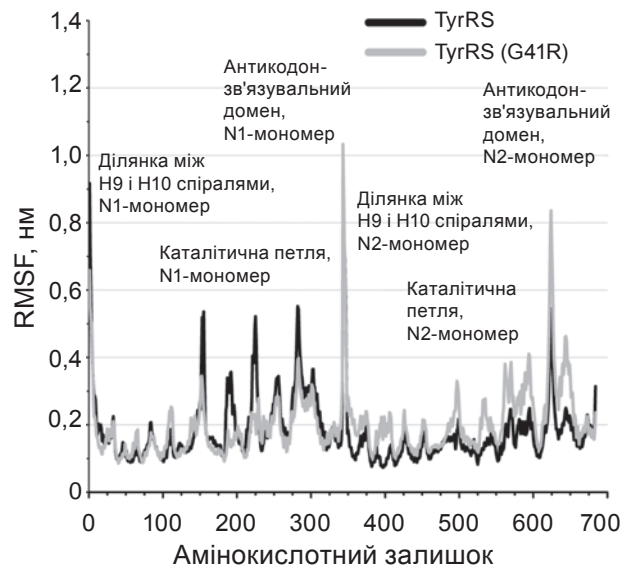


Рис. 4. Середньоквадратичні флуктуації RMSF (Root-Mean-Square Fluctuations) у розрахунку на Ca атом із кожного амінокислотного залишку в нанометрах у часовому інтервалі 60–100 нс. Найвищий пік відповідає області Met1 мономера N1 та початку мономера N2 (відповідає номеру 343 по осі X)

антикодонзв'язувального сайту у середньому на 0,2 нм більші, ніж для ензиму дикого типу в мономері N2, що характеризує асиметрію рухів відносно мономера N1.

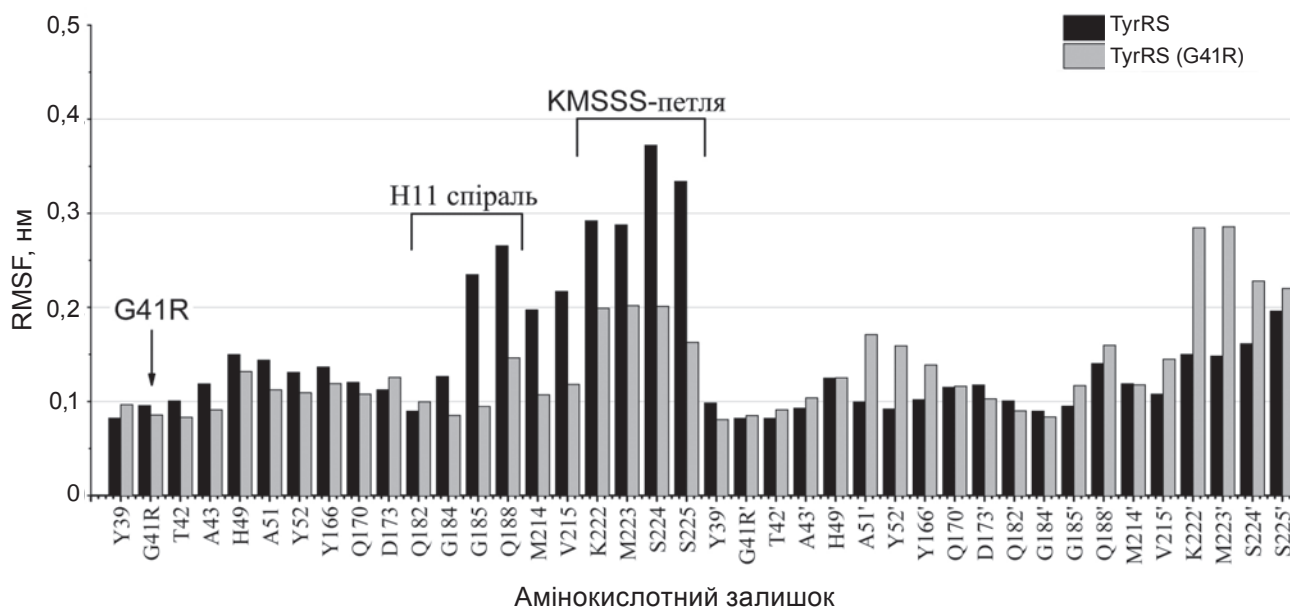


Рис. 5. Середньоквадратичні флуктуації RMSF активного центру TyrRS та її мутантної форми G41R, в розрахунку на Ca атом кожного амінокислотного залишку у часовому інтервалі 60–100 нс

Оскільки мутація G41R локалізована в активному центрі ензиму, нами проведено детальний аналіз середньоквадратичних флуктуацій (RMSF) в активному центрі TyrRS людини для Ca атомів кожного амінокислотного залишку (рис. 5). Для аналізу обрано амінокислотні залишки, що належать до активного центру *HsTyRS*: Y39, G41(R41), T42, A43, H49, A51, Y52, Y166, Q170, D173, Q182, G184, G185, Q188, M214, V215, K222, M223, S224, S225 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_003671.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_003671.1)). Найбільші значення середньоквадратичних відхилень спостерігаються для каталітичної KMSSS-петлі з максимальним показником 0,38 нм відносно конформації початкової структури для мономера N1. У мутантної форми TyrRS G41R в каталітичній петлі спостерігаються значення середньоквадратичних відхилень не більші ніж 0,29 нм для мономера N2. Отже, цей мутант має жорсткішу конформацію в порівнянні з ензимом дикого типу, що супроводжується формуванням компактнішого стану за результатами аналізу радіуса гірації (рис. 3, Б). У процесі молекулярної динаміки виявлено шість залишків, які формують водневі зв'язки з Arg41 із розрахунку часу життя > 10% для 100 нс траєкторії: Tyr39 – 62%, Gln188 – 22%, His77 – 18%, Tyr123 – 18%, Asp173 – 17% і Gln170 – 13%.

Аналіз змін вторинної структури в процесі молекулярної динаміки (DSSP, Define Secondary Structure of Proteins) мутантної форми G41R *HsTyRS* виявив формування метастабільної  $\beta$ -структури (~80% від усього часу, із 20 до 100 нс) в одній з субодиниць димеру ензиму, до якої входять залишки Lys147 – Glu157, що локалізовані біля інтерфейсу димеру і входять до складу петлі CP1-вставки [15] згортки Россмана (рис. 6). Структуру ензиму станом на 100 нс молекулярної динаміки візуалізовано у VMD 1.9.1 (рис. 7). При цьому виявлено формування водневих зв'язків між  $\beta$ -структурою Lys147 – Glu157 і залишком каталітичної петлі Ser225 – 24% часу, і залишками Lys190 – 51%, і Thr193 – 15%, які належать до H11 спіралі, що є спільною у зв'язках з Arg41 (Gln188 – 22%).

За результатами аналізу активного центру TyrRS методом SASA (Solvent Accessible Surface Area) виявлено, що експонованість молекулярної поверхні активного центру мутантної форми G41R у середньому на 20 нм<sup>2</sup> менша, ніж в ензимі дикого типу. Це можна пояснити тим, що каталітична петля мутантного ензиму стає менш рухливою та компактнішою біля активного центру, зменшуючи його об'єм, а також стеричним прикриттям кишені, в якій має локалізуватися L-тирозин. Найменші усереднені



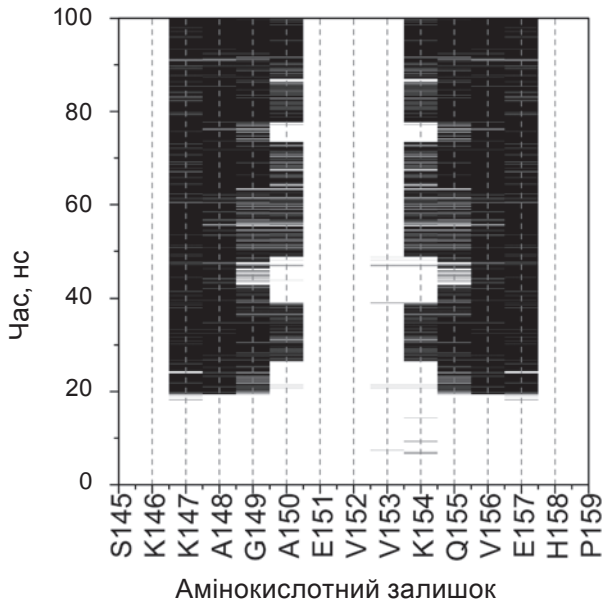


Рис. 6. Карта вторинної структури для мутантної форми TyrRS G41R. Чорним кольором показана область формування  $\beta$ -структурного елемента в період 20–100 нс за участю амінокислотних залишків Lys147 – Glu157

показники SASA для залишків активного центру спостерігаються на рівні 70  $\text{nm}^2$  у мутантної форми G41R (рис. 8).

Водночас Arg41 на 60% є більш експонованим (8,5  $\text{nm}^2$  відносно 5,3  $\text{nm}^2$  для Gly41) і, як зазначено вище, супроводжується формуванням додаткових водневих зв'язків, які можуть пояснювати жорсткішу конформацію активного центру мутантної форми.

Таким чином, комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки мутантної форми G41R HsTyrRS виявило формування антипаралельної  $\beta$ -шпильки в неструктурованій ділянці між спіралями H9 і H10 CP1-вставки згортки Россмана за участю Lys147 – Glu157 у часовому інтервалі 20–100 нс (80% часу). Показано, що формування водневих зв'язків між петлею CP1-вставки Lys147 – Glu157 та залишками каталітичної KMSSS-петлі призводить до істотного зниження флуктуацій петлі. Виявлено зменшення експонованості молекулярної поверхні активного центру мутантної форми G41R HsTyrRS у середньому на 20  $\text{nm}^2$ . Висловлено припущен-

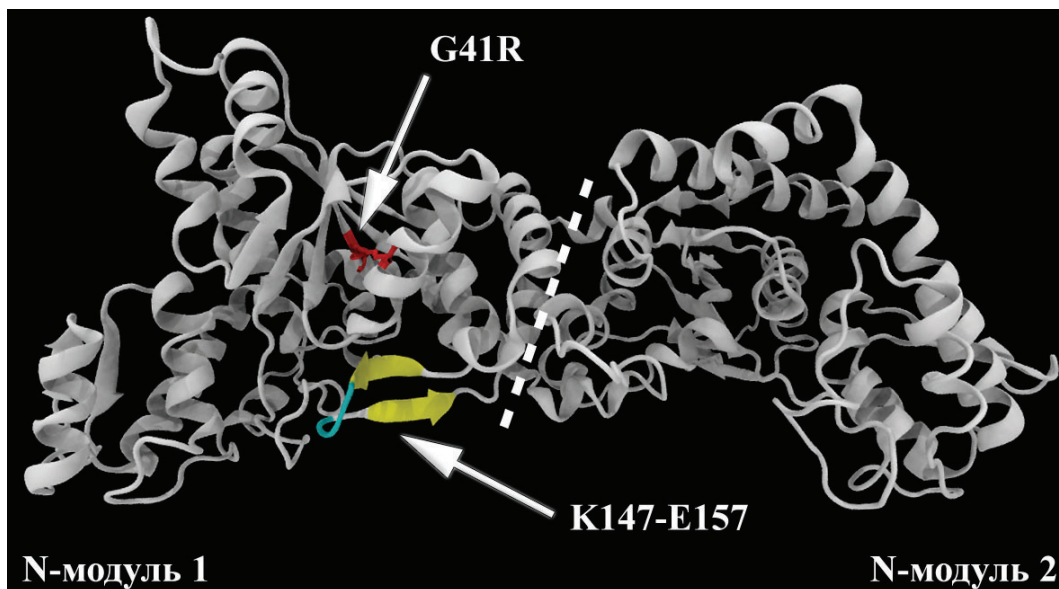


Рис. 7. Структура мутантної форми TyrRS G41R станом на 100 нс молекулярної динаміки. Формування антипаралельної  $\beta$ -структури Lys147 – Glu157, послідовність якої належить до CP1-вставки, відображено жовтим кольором, а її неструктурована частина ділянки – блакитним кольором. Формування  $\beta$ -структурного елемента спостерігається тільки в одному мономері (N1)



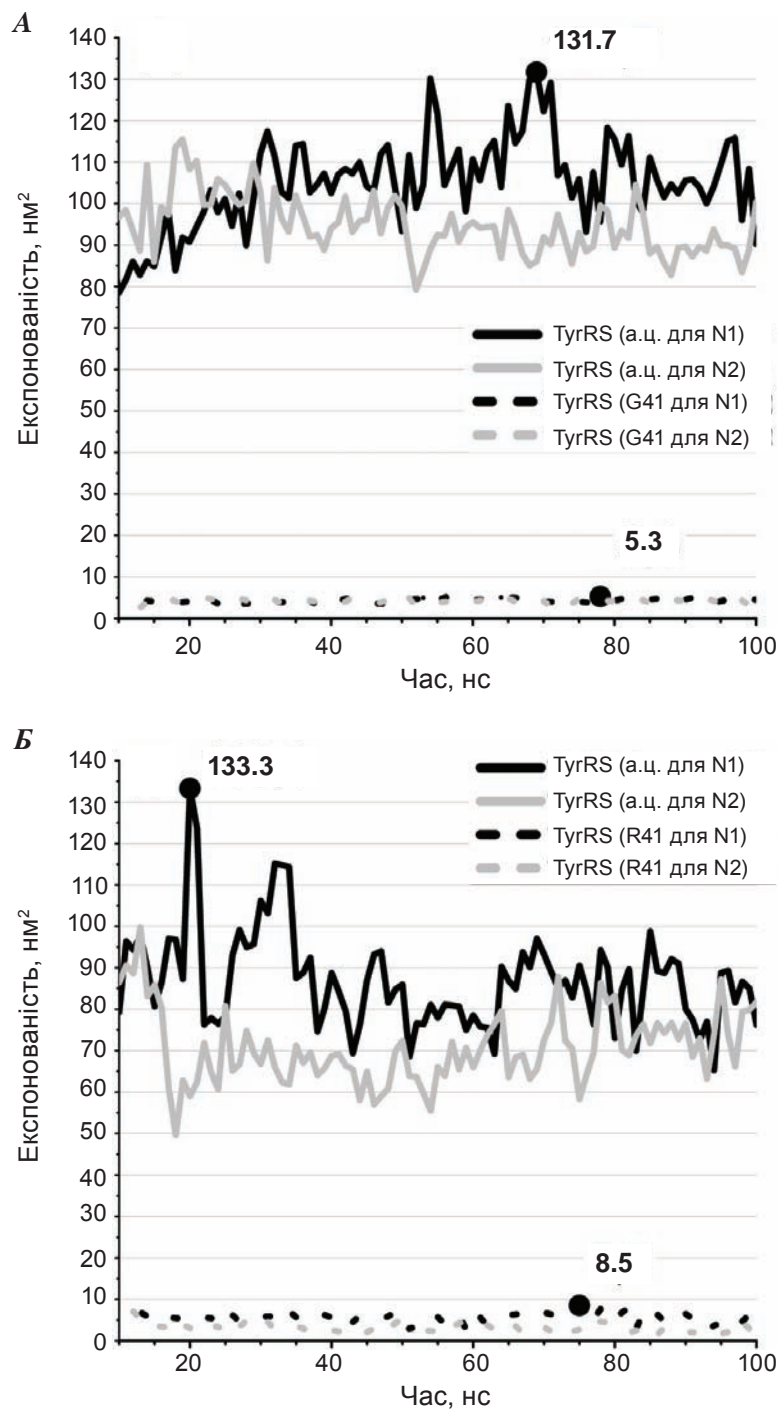


Рис. 8. Зміни площі доступності розчиннику залишків активного центру: Y39, G41(R41), T42, A43, H49, A51, Y52, Y166, Q170, D173, Q182, G184, G185, Q188, M214, V215, K222, M223, S224 та S225 у процесі динаміки. Чорний колір відображає значення для мономера N1, сірий – для мономера N2. Додатково відображено аналіз експонованості окремих залишків G41 і R41 у траєкторіях молекулярної динаміки TyrRS (А) та її мутантної форми G41R (Б) відповідно

ня, що виявлені конформаційні ефекти можуть призводити як до зміни конформації активного центру, так і до зміни специфічних взаємодій мутантної форми G41R *HsTyrRS* з її протеїнами-партнерами у локальному інтерактомі апарату біосинтезу протеїнів, що в результаті спричинює розвиток нейродегенеративного захворювання Шарко-Мари-Туса.

**Подяка.** Роботу підтримано грантами: Державної цільової науково-технічної програми впровадження і застосування грид-технологій на 2009–2013 роки та комплексної цільової програми НАН України «Грид-інфраструктура і грид-технології для наукових і науково-прикладних застосувань» 2014–2015 рр. Автори висловлюють подяку докт. фіз.-мат. наук С. О. Єсилевському за обговорення результатів та адміністраторам Української національної грид-інфраструктури за технічну підтримку. Робота частково підтримана грантом на обчислювальні ресурси HPC GRANT 2012–2013 CASPUR (tts. 209036, Італія) спільно в проєкті з проф. Т. М. Бриком і проф. Tullio Scopigno. О. В. Савицький підтриманий молодіжними грантами: YTF FEBS від Європейського біохімічного товариства (2010–2014 роки), EBSA 2013 від Європейського біофізичного товариства та стипендією НАН України для молодих вчених (2012–2014 роки).

### КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ МУТАНТНОЙ ФОРМЫ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ G41R, АССОЦИИРОВАННОЙ С НЕЙРОПАТИЕЙ ШАРКО-МАРИ-ТУСА

*А. В. Савицький, А. І. Корнелюк*

Институт молекулярной биологии  
и генетики НАН Украины, Киев;  
e-mail: savytskyi@moldyngrid.org

Построена компьютерная модель пространственной структуры мутантной формы G41R тирозил-тРНК синтетазы человека (*HsTyrRS*), структурные координаты которой не определены экспериментально. Проведено компьютерное моделирование молекулярной динамики *HsTyrRS* в интервале 100 нс и изучено влияние мутации G41R, ассоциированной с нейропатией Шарко-Мари-Туса, на локальные конформационные изменения энзима. Для расчетов молеку-

лярной динамики использованы грид-ресурсы Украинского национального грида и виртуальной лаборатории MolDynGrid. Методом молекулярной динамики показано формирование антипараллельной  $\beta$ -шпильки в неструктурированном участке между спиралями H9 и H10 в мутантной форме G41R (CP1-вставка свертки Россмана) при участии аминокислотных остатков Lys147 – Glu157.

**Ключевые слова:** мутантная форма тирозил-тРНК синтетазы (*HsTyrRS*), нейропатия Шарко-Мари-Туса (ШМТ), G41R, грид, MolDynGrid, CP1-вставка, молекулярная динамика, компьютерное моделирование.

### COMPUTATIONAL MODELING OF MOLECULAR DYNAMICS OF G41R MUTANT FORM OF HUMAN TYROSYL-tRNA SYNTHETASE, ASSOCIATED WITH CHARCOT- MARIE-TOOTH NEUROPATHY

*O. V. Savytskyi, A. I. Kornelyuk*

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: savytskyi@moldyngrid.org

The computational structural models of human tyrosyl-tRNA synthetase and its mutant form G41R (Charcot-Marie-Tooth associated) were constructed, while their whole structural coordinates are still unknown. Grid-services of MolDynGrid Virtual Laboratory and Ukrainian National Grid-infrastructure were used for molecular dynamics (MD) simulations. The analyses of trajectories of MD simulations have shown the  $\beta$ -sheet formation in region Lys147 – Glu157 between H9 and H10 helices (CP1 insertion of Rossman fold) for G41R mutant.

**Key words:** mutant form of tyrosyl-tRNA synthetase (*HsTyrRS*), Charcot-Marie-Tooth neuropathy, G41R, grid computing, MolDynGrid, CP1 insertion, molecular dynamics, computational modeling.

### References

1. Antonellis A., Lee-Lin S. Q., Wasterlain A., Leo P., Quezado M., Goldfarb L. G., Myung K., Burgess S., Fischbeck K. H. and Green E. D. Functional analyses of glycyl-tRNA synthetase mutations suggest a key role for tRNA-charging

- enzymes in peripheral axons. *J. Neurosci.* 2006; 26(41): 10397-10406.
2. Antonellis A., Ellsworth R. E., Sambuughin N., Puls I., Abel A., Lee-Lin S. Q., Jordanova A., Kremensky I., Christodoulou K., Middleton L. T., Sivakumar K., Ionasescu V., Funalot B., Vance J. M., Goldfarb L. G., Fischbeck K. H., Green E. D. Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *Am. J. Hum. Genet.* 2003; 72(5): 1293-1299.
  3. Dubourg O., Azzedine H., Yaou R. B., Pouget J., Barois A., Meininger V., Bouteiller D., Ruberg M., Brice A., LeGuern E. The G526R glycyl-tRNA synthetase gene mutation in distal hereditary motor neuropathy type V. *Neurology.* 2006; 66(11): 1721-1726.
  4. Seburn K. L., Nangle L. A., Cox G. A., Schimmel P., Burgess R. W. An active dominant mutation of glycyl-tRNA synthetase causes neuropathy in a Charcot-Marie-Tooth 2D mouse model. *Neuron.* 2006; 51(6): 715-726.
  5. Nangle L. A., Zhang W., Xie W., Yang X. L., Schimmel P. Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant tRNA synthetases linked to altered dimer interface and neurite distribution defect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104(27): 11239-11244.
  6. Jordanova A., Irobi J., Thomas F. P., Van Dijk P., Meerschaert K., Dewil M., Dierick I., Jacobs A., De Vriendt E., Guergueltcheva V., Rao C. V., Tournev I., Gondim F. A., D'Hooghe M., Van Gerwen V., Callaerts P., Van Den Bosch L., Timmermans J. P., Robberecht W., Gettemans J., Thevelein J. M., De Jonghe P., Kremensky I., Timmerman V. Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Nat. Genet.* 2006; 38(2): 197-202.
  7. Jordanova A., Thomas F. P., Guergueltcheva V., Tournev I., Gondim F. A., Ishpekova B., De Vriendt E., Jacobs A., Litvinenko I., Ivanova N., Buzhov B., De Jonghe P., Kremensky I., and Timmerman V. Dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth type C maps to chromosome 1p34-p35. *Am. J. Hum. Genet.* 2003; 73(6): 1423-1430.
  8. Lee J. W., Beebe K., Nangle L. A., Jang J., Longo-Guess C. M., Cook S. A., Davison M. T., Sundberg J. P., Schimmel P., Ackerman S. L. Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature.* 2006; 443(7107): 50-55.
  9. Roy H., Ibba M. Molecular biology: sticky end in protein synthesis. *Nature.* 2006; 443(7107): 41-42.
  10. Berger P., Niemann A. and Suter U. Schwann cells and the pathogenesis of inherited motor and sensory neuropathies (Charcot-Marie-Tooth disease). *Glia.* 2006; 54(4): 243-257.
  11. Roa B. B., Greenberg F., Gunaratne P., Sauer C. M., Lubinsky M. S., Kozma C., Meck J. M., Magenis R. E., Shaffer L. G., Lupski J. R. Duplication of the PMP22 gene in 17p partial trisomy patients with Charcot-Marie-Tooth type-1 neuropathy. *Hum. Genet.* 1996; 97(5): 642-649.
  12. Froelich C. A., First E. A. Dominant Intermediate Charcot-Marie-Tooth disorder is not due to a catalytic defect in tyrosyl-tRNA synthetase. *Biochemistry.* 2011; 50(33): 7132-7145.
  13. Xie W., Nangle L. A., Zhang W., Schimmel P., Yang X. L. Long-range structural effects of a Charcot-Marie-Tooth disease-causing mutation in human glycyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104(24): 9976-9981.
  14. Odynets K. A., Kornelyuk A. I. Bioinformatical analysis of influence of human tyrosyl-tRNA synthetase mutations associated with neuropathy Charcot-Marie-Tooth, type C, on its local spatial structure properties. *Biopolym. Cell.* 2007; 23(5): 449-460.
  15. Yang X.-L., Skene R. J., McRee D. E., Schimmel P. Crystal structure of a human aminoacyl-tRNA synthetase cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99(24): 15369-15374.
  16. Kornelyuk O. I., Mintser O. P. Up-to-date computer grid-technologies and their application in medical researches. *Med. Inform. Eng.* 2008; 1: 23-29.
  17. Salnikov A. O., Sliusar I. A., Sudakov O. O., Savytskyi O. V., Kornelyuk A. I. MolDynGrid virtual laboratory as a part of Ukrainian Academic Grid infrastructure. Proceedings of the 5th IEEE International Workshop on Intelligent Data Acquisition and Advanced Computing Systems: Technology and Applications, IDAACS 2009. 2009; 1: 237-240.
  18. Salnikov A., Sliusar I., Sudakov O., Savytskyi O., Kornelyuk A. Virtual laboratory MolDynGrid as a part of scientific infrastructure for biomolecular simulations. *Int. J. Computing.* 2010; 9(4): 294-300.

19. Mykuliak V. V., Dragan A. I. and Kornelyuk A. I. Structural states of the flexible catalytic loop of M. tuberculosis tyrosyl-tRNA synthetase in different enzyme-substrate complexes. *Eur. Biophys. J.* 2014; 43(12): 613-22.
20. Salnikov A., Sudakov O., Savytskyi O., Sliusar I., Kornelyuk A. The integrated environment of virtual laboratory moldyngrid for calculation of molecular dynamics of biopolymers. *Med. Inform. Eng.* 2010; 1: 24-32.
21. Avramenko V., Zagorodniy A., Martynov Ye. Peculiarities of grid-technology application in medicine. *Visnuk NAN Ukrainy.* 2008; 10: 5-15.
22. Yesylevskyy S. O., Savytskyi O. V., Odynets K. A., Kornelyuk A. I. Interdomain compactization in human tyrosyl-tRNA synthetase studied by the hierarchical rotations technique. *Biophys. Chem.* 2011; 154(2-3): 90-98.
23. Savytskyi O. V., Yesylevskyy S. O., Kornelyuk A. I. Asymmetric structure and domain binding interfaces of human tyrosyl-tRNA synthetase studied by molecular dynamics simulations. *J. Mol. Recognit.* 2013; 26(2): 113-120.
24. Hess B., Kutzner Carsten, van der Spoel David and Lindahl Erik GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theor. Comp.* 2008; 4(3): 435-447.
25. Oostenbrink C., Villa A., Mark A. E., van Gunsteren W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* 2004; 25(13): 1656-1676.
26. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 1996; 14(1): 33-8, 27-8.
27. Savytskyi O. V., Sliusar I. A., Yesylevskyy S. O., Stirenko S. G., Kornelyuk A. I. Integrated tools for molecular dynamics simulation data analysis in the MolDynGrid virtual laboratory. Proceedings of the 6-th IEEE International Conference on Intelligent Data Acquisition and Advanced Computing Systems: Technology and Applications, IDAACS 2011. 2011; 1: 209-211.
28. Yesylevskyy S. O. Pteros 2.0: Evolution of the fast parallel molecular analysis library for C++ and python. *J. Comput. Chem.* 2015; 36(19): 1480-1488.

Отримано 22.10.2015