

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

**САВИЦЬКИЙ Олександр Вячеславович**



УДК 577.217.32

**КОМП'ЮТЕРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДИНАМІКИ  
*H. sapiens* ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ ТА ЇЇ МУТАНТНИХ ФОРМ**

03.00.03 – молекулярна біологія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

**Київ – 2017**

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ.

**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  
**Сиволоб Андрій Володимирович**,  
ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського  
національного університету імені Тараса Шевченка,  
професор кафедри загальної та медичної генетики;

кандидат біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Карпов Павло Андрійович**,  
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки  
НАН України», завідувач лабораторії біоінформатики  
та структурної біології.

Захист відбудеться 30 травня 2017 року о 10<sup>30</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (03680, м. Київ, вул. Заболотного, 150).

Автореферат розіслано "28" квітня 2017 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук, с.н.с.



І.В. Крупська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Тирозил-тРНК синтетаза належить до родини ферментів аміноацил-тРНК синтетаз, які виникли на найдревніших стадіях еволюції і відіграють ключову роль на дорибосомному етапі біосинтезу протеїнів. Окрім основної функції – аміноацилювання тРНК, синтетази можуть бути залучені також до неканонічних процесів, таких як регуляція експресії генів, трансляція, апоптоз, сплайсинг, прояв цитокінових властивостей тощо. Залучення синтетаз до перебігу різноманітних клітинних процесів дозволяє розглядати їх як перспективні мішені для розробки лікарських препаратів. Вивчення міжмолекулярних взаємодій, структурних мотивів та їх функцій, необхідних для цих взаємодій, забезпечить фундаментальне розуміння того, яким чином синтетази тісно пов'язані із сигнальними шляхами клітини. Наявність цитокінових властивостей у фрагментів тирозил-тРНК синтетази викликає велику зацікавленість у їх використанні як перспективних терапевтичних препаратів у медицині. Порушення основних або неканонічних функцій синтетаз можуть призводити до аутоімунних захворювань, злоякісних новоутворень та нейропатій. Однією з найпоширеніших хвороб, пов'язаною з мутаціями генів деяких синтетаз, є нейропатія Шарко-Марі-Туса.

Захворювання Шарко-Марі-Туса (Charcot-Marie-Tooth, CMT) – поширений спадковий неврологічний розлад у людини, який зустрічається із частотою 1 на 2500 випадків, і розповсюджений серед усіх рас та етнічних груп (Jani-Acsadi *et al.*, 2008, Shy *et al.*, 2001). CMT належить до групи гетерогенних захворювань, які вражають периферичну нервову систему, що призводять до її дегенерації. Демієлінізація аксонів призводить у більшості випадків до їх вторинної дегенерації, що в подальшому ініціює виникнення м'язової атрофії, втрати здатності їх функціонувати (Martini, 2001). Відповідно до генетичних і клінічних досліджень розділяють чотири типи захворювань (CMT 1, 2, 3, 4) та X-форму, тісно пов'язану із цими типами. Молекулярні механізми цього гетерогенного захворювання є досі невідомими. Деякі мутантні форми тирозил-тРНК синтетази (TyrRS) призводять до виникнення проміжного типу захворювання – DI-CMTС, яке характеризується порушеннями мієлінової оболонки за автосомно-домінантним типом успадкування (Jordanova *et al.*, 2003, 2006). Для розуміння молекулярних механізмів впливу мутацій на функції TyrRS необхідна вичерпна інформація про просторову структуру ферменту, молекулярну динаміку та конформаційні зміни, які індукуються мутаціями.

Тривимірна структура повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази людини досі невідома, є інформація лише про координати атомів окремих N- і C-кінцевих модулів, отриманих методом рентгеноструктурного аналізу. Однак цей метод не дозволяє вивчати конформаційну динаміку ферментів та визначати координати високорухливих ділянок. Сучасні методи комп'ютерної структурної біології із використанням високопродуктивних обчислень дозволяють проводити моделювання молекулярної динаміки протеїнів в наносекундних часових інтервалах, що дає важливу інформацію про конформаційні зміни ферментів.

Отже, вивчення просторової структури і динаміки повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази людини та її мутантних форм, пов'язаних з нейродегенеративною хворобою, є важливим кроком для розуміння молекулярних механізмів функціонування ферменту та впливу мутацій на його функції.

**Зв'язок роботи із науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційну роботу виконано у відділі білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України відповідно з планами науково-дослідної роботи відділу у рамках бюджетних тем: “Динамічні аспекти функціонування еукаріотної тирозил-тРНК синтетази та вивчення впливу мутацій на процес аміноацилювання тРНК та виникнення нейродегенеративних захворювань (2008–2012 рр., державний реєстраційний номер 0107V004938), “Дослідження локальних конформаційних змін та формування метастабільних структурних елементів в тирозил-тРНК синтетазах прокариотів та еукаріотів” (2013–2017 рр., державний реєстраційний номер 0112U003747), “Розвинення віртуальної лабораторії MolDynGrid як частини Української академічної Грід-інфраструктури” (2009 р., державний реєстраційний номер 01090004889), “Розробка та впровадження комп'ютерних сервісів для аналізу молекулярної динаміки білків в віртуальній лабораторії MolDynGrid та її інтеграція в європейську грід-інфраструктуру” (2010–2013 рр., державний реєстраційний номер 0110U005745), “Розробка та адаптація програмного забезпечення кластеру СКІТ-4 для вирішення задач комп'ютерної структурної біології” (2013–2015 рр., державний реєстраційний номер 0113U005318) та “Розробка та впровадження Cloud-технологій в роботу грід-сервісів віртуальної лабораторії MolDynGrid” (2014–2016 рр., державний реєстраційний номер 0114U004667).

**Мета і задачі досліджень.** Мета роботи – провести комп'ютерне моделювання структури та молекулярної динаміки тирозил-тРНК синтетази *H. sapiens* та її мутантних форм, а також дослідити конформаційні зміни структури у фермент-субстратних комплексах.

Відповідно до мети було поставлено наступні завдання:

1. Побудувати повноатомну модель просторової структури димера повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази людини (*HsTyrRS*) та провести її оптимізацію.
2. Оптимізувати та адаптувати методики розрахунків молекулярної динаміки *HsTyrRS* та аналізу отриманих траєкторій з використанням обчислень у грід-середовищі.
3. Провести дослідження молекулярної динаміки повнорозмірної *HsTyrRS*, проаналізувати взаємодію між її N- і C-кінцевими модулями та перевірити гіпотезу екранування цитокінового ELR-мотиву.
4. Побудувати просторові структури мутантних форм *HsTyrRS*, пов'язаних з нейропатією Шарко-Марі-Туса (DI-CMTC), та охарактеризувати молекулярну динаміку і конформаційні зміни фермента, пов'язані з мутаціями.

5. Провести комп'ютерне моделювання комплексів *HsTyrRS* з субстратами: L-тирозином, АТР, проміжним продуктом тирозил-аденілатом та відповідною тРНК<sup>Tyr</sup>.

6. Вивчити вплив мутацій СМТ на взаємодії між *HsTyrRS* та макромолекулами-партнерами: тРНК<sup>Tyr</sup> та фактором елонгації.

*Об'єкт дослідження:* молекулярні основи конформаційної рухливості протеїнів та їх мутантних форм.

*Предмет дослідження:* структурна динаміка *HsTyrRS*, механізми міжмодульних взаємодій, локальні конформаційні зміни фермента.

*Методи дослідження:* метод комп'ютерного моделювання та оптимізації просторової структури протеїнів, метод комп'ютерного мутагенезу, метод моделювання молекулярної динаміки, метод молекулярного докінгу, методи комп'ютерного моделювання в грід-середовищі.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Отримані у дисертації дані розширюють існуючі уявлення щодо функціонування тирозил-тРНК синтетази людини у розчині, а саме міжмодульних взаємодій, динаміки активного центру, механізмів взаємодії з субстратами (в тому числі впізнавання гомологічної тРНК<sup>Tyr</sup>), впливу мутацій при нейродегенеративних захворюваннях на структуру та динаміку фермента.

Вперше побудовано структурну модель повнорозмірної *HsTyrRS* та проведено комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки в часовому інтервалі 100 нс. Описано інтерфейси міжмодульних взаємодій та підтверджено гіпотезу екранування цитокінового ELR-мотиву С-кінцевим модулем синтетази. Показано динамічне формування антипаралельних  $\beta$ -стрендів у неструктурованій петлі CP1-вставки для мутантних форм тирозил-тРНК синтетази. Запропоновано модель впливу мутацій СМТ на взаємодії між *HsTyrRS* та її молекулами-партнерами. Створено базу просторових структур TyrRS в комплексах з субстратами, в т.ч. із відповідною тРНК<sup>Tyr</sup>.

**Особистий внесок здобувача.** Особисто здобувачем здійснено інформаційний пошук та аналіз літературних даних за темою роботи. У всіх опублікованих наукових роботах за темою дисертаційної роботи особистий внесок здобувача полягає у: моделюванні повнорозмірної *HsTyrRS* та її мутантних форм; підготовці і проведенні розрахунків молекулярної динаміки *HsTyrRS* та її мутантних форм; визначенні оптимальних умов розрахунків; підготовці топологій силових полів для субстратів; побудові структурних комплексів димеру *HsTyrRS* з тРНК<sup>Tyr</sup> та евкаріотичним фактором елонгації eEF1A2; проведенні розрахунків молекулярної динаміки *HsTyrRS* в комплексах з 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., проф., член-кор. НАН України О.І. Корнелюку за керівництво роботою; д.ф.-м.н. С.О. Єсилевському; д.б.н., проф., член-кор. НАН України Д.М. Говоруну; д.б.н., проф., член-кор. НАН України М.А. Тукало; д.б.н., проф. Б.С. Негруцькому за участь в обговоренні результатів та їх

інтерпретації, усім колегам, які були долучені до отримання результатів роботи та адміністраторам грид-інфраструктур (UNG, EGI), особливо к.т.н. А.О. Сальнікову та к.т.н. Є.А. Слюсару за підтримку високотехнологічних грид-розрахунків.

**Апробація результатів дисертації.** Основні наукові результати було представлено на IEEE 5<sup>th</sup> International Workshop on Intelligent Data Acquisition and Advanced Computing Systems: Technology and Applications (IDAACS'2009) (Rende, Cosenza, Italy, 2009), FEBS Combined Practical and Lecture Course “Physical Chemistry of Biointerfaces (San Sebastian, Spain, 2010), Конгреси Українського біофізичного товариства (Луцьк-Світязь, Україна, 2011, 2015), 4-й міжнародній конференції “Molecular Biology: Advances and Perspectives” (Київ, Україна, 2011), 6<sup>th</sup> IEEE International Conference IDAACS 2011 (Prague, Czech Republic, 2011), FEBS Workshop “Cell Biology and Pharmacology of Mendelian Disorders” (Vico Equense, Naples, Italy, 2011), “NordUGrid 2012” Conference (Uppsala, Sweden, 2012), eSENCE International Workshop on “Macromolecular Structure and Dynamics” (Uppsala, Sweden, 2013), International Conference “NORDUGRID-2013: Distributed systems and Big Data – towards new horizons” (Šiauliai, Lithuania, 2013), 6<sup>th</sup> Theoretical Biophysics Symposium (Gothenburg, Sweden, 2013), 9<sup>th</sup> European Biophysics Congress (Lisbon, Portugal, 2013), Joint FEBS/EMBO Lecture Course and IUBMB Advanced School “Protein interactions, assemblies and human disease” (Spetses island, Greece, 2013); Opening of the Academic Year 2013/2014 at Biocentrum Ochota” (Warsaw, Poland, 2013), FEBS Young Scientists' Forum 2014 and FEBS EMBO 2014 Conference (Paris, France, 2014), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014), “EGI Community Forum 2015” (Bari, Italy, 2015), International Workshop on “High Performance Molecular Dynamics@CINECA” (Bologna, Italy, 2015), FEBS/IUBMB Advanced Lecture Course "Molecular basis of human diseases: 50 years anniversary of Spetses summer schools" (Spetses island, Greece, 2016), щорічних звітних конференціях молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових праць, що включають 9 статей, з яких 6 у фахових виданнях (5 з яких належать до наукометричної бази даних “Scopus”: *Journal of Molecular Recognition*, *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, *Biophysical Chemistry*, *Ukr.Biochem.J.*, *Biopolym. Cell*), 7 публікацій за матеріалами і тезами у збірниках закордонних і вітчизняних з’їздів та конференцій.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 220 найменувань. Дисертацію викладено на 146 сторінках стандартного машинопису, вона містить 42 рисунків та 7 таблиць.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали та методи досліджень

Для одержання структури повнорозмірної *HsTyrRS* проведено комп'ютерне моделювання *in silico* з використанням пакету програм Modeller v9.7 (Eswar *et al.*, 2006). В якості структурних матриць N- і C-кінцевих модулів використано кристалографічні структури *HsTyrRS*, які депоновані в базі даних Protein Data Bank (PDB): 1N3L:A (ділянка A4–P342) (Yang *et al.*, 2002), 1NTG:A (ділянка P360–S528) (Yang *et al.*, 2003). 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 v9.7 як петлеві структури. Характеристику змодельованих структур відсортовано одночасно за такими критеріями: Modeller Objective Function (molpdf), Discrete Optimized Protein Energy (DOPE), Normalized DOPE score, MolProbity Score. Побудова димеру повнорозмірної *HsTyrRS* виконана з використанням програмного пакету Swiss-PDB Viewer 4.0 (Guex & Peitsch, 1997) методом суперпозиції з кристалографічною структурою (PDB: 1N3L).

Для отримання структури мутантних форм *HsTyrRS* застосовано метод комп'ютерного мутагенезу в програмному пакеті Modeller 9.7 із використанням відповідних алгоритмів (*mutate\_model.py* і *model-loop.py*). Для моделювання комплексів з низькомолекулярними субстратами використано метод молекулярного докінгу в програмі AutoDock 4.2.6 (Morris *et al.*, 2009).

За допомогою онлайн-інструменту ModeRNA Server (Rother *et al.*, 2011) проведено пошук структурних матриць для моделювання за наявною нуклеотидною послідовністю тРНК<sup>Tyr</sup> людини. Обрано структурні комплекси синтетаз з відповідною тРНК<sup>Tyr</sup>: *Methanocaldococcus jannaschii* та *Saccharomyces cerevisiae* (PDB коди: 1J1U та 2DLC відповідно). Для побудови структури тРНК<sup>Tyr</sup> людини проведено молекулярне моделювання за допомогою програмного пакета MacroMolecule Builder 2.8 (Flores *et al.*, 2011, Tek *et al.*, 2016).

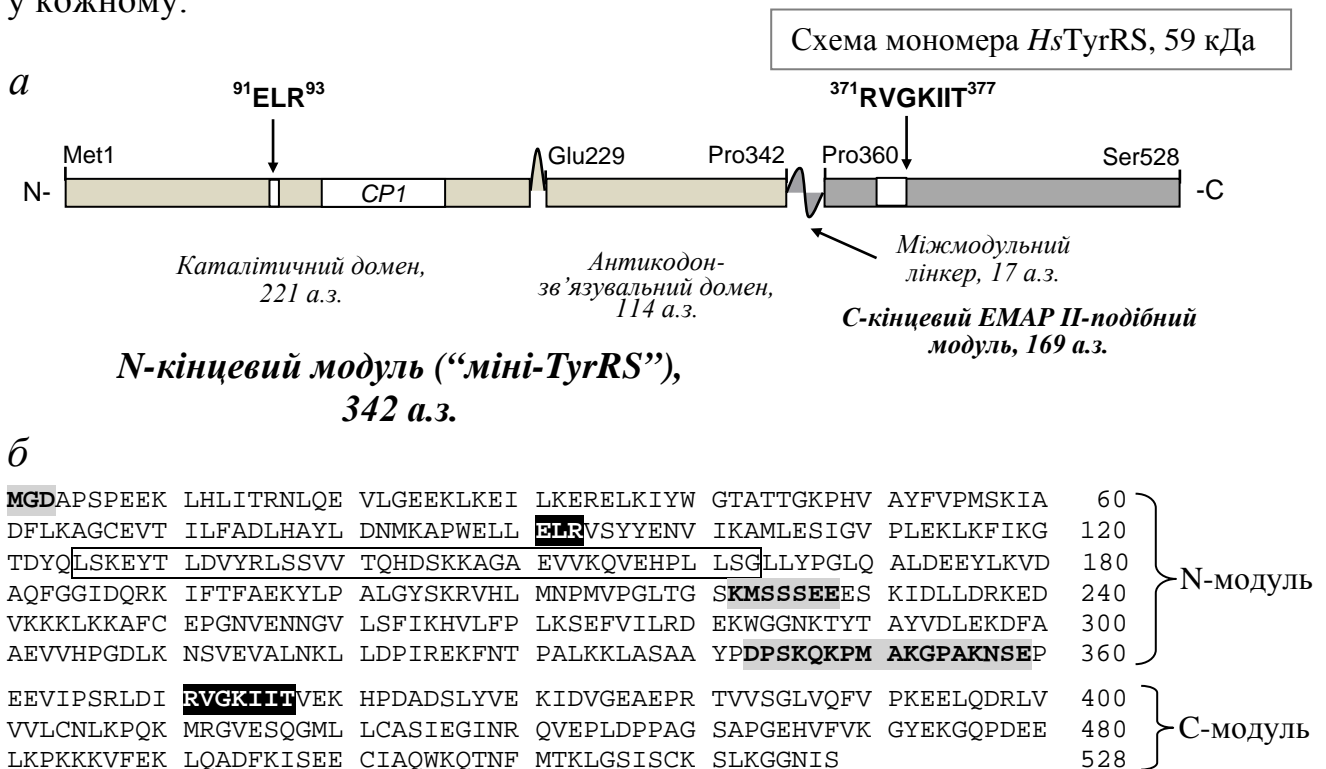
Для побудови структурного комплексу *HsTyrRS*\*тРНК<sup>Tyr</sup> з фактором елонгації eEF1A2 взято структуру *Oryctolagus cuniculus* (кроля) (PDB код: 4C0S) (Crepin *et al.*, 2014) в якості матриці, що на 100% ідентична за послідовністю до eEF1A2 людини. Для побудови комплексу *HsTyrRS* з доменом I та доменом II фактору елонгації eEF1A2 застосовано метод молекулярного докінгу в програмі ClusPro 2.0.

Для розрахунків молекулярної динаміки застосовували програмний пакет GROMACS 4 (Hess *et al.*, 2008). В розрахунках використовували силові поля: GROMOS 53a6 (43a1) та CHARMM27 (Oostenbrink *et al.*, 2004, MacKerell *et al.*, 2000). Температуру системи (310 K) і тиск (1 атм) підтримували постійними, використовуючи алгоритми *v-rescale* і *parrinello-rahman*, відповідно. Розрахунки молекулярної динаміки проводили у водно-іонному оточенні з концентрацією іонів K<sup>+</sup> та Cl<sup>-</sup> 150 мМоль.

Енергії зв'язування розглядали як суму енергій ван-дер-ваальсових взаємодій (потенціал Ленарда-Джонса) та енергії електростатичних взаємодій (закон Кулона). Аналіз водневих Н-зв'язків проведено за допомогою програми *g\_hbond*. Для визначення їхньої наявності використано наступні критерії:  $r \leq r_{\text{HB}} = 0,35 \text{ нм}$ ;  $\alpha \leq \alpha_{\text{HB}} = 30^\circ$ .

## Результати досліджень та їхнє обговорення

**Моделювання просторової структури повнорозмірної HsTyrRS.** HsTyrRS є гомодимером  $\alpha 2$ -типу з молекулярною масою 2x59 кДа (рис. 1а). Експериментально структура повнорозмірної цитоплазматичної TyrRS досі є невизначеною, відомі лише координати окремих N- та С-кінцевих модулів. Із застосуванням програмного пакету Modeller v9.7 добудована структура відсутніх ділянок: N-кінця синтетази (M1–D3), каталітичної петлі (K222–E228) та міжмодульного лінкера (D343–E359) (рис. 1б). В результаті отримано 500 структур мономерів синтетази, які належать до 5-ти ансамблів по 100 структур у кожному.



**Рис. 1.** (а) – доменна організація окремої субодиниці HsTyrRS (N-модуль має аміноацилюючу активність, а С-модуль є гомологічним до цитокіну EMAP II). Положення двох цитокінових мотивів:  $^{91}\text{ELR}^{93}$  і  $^{371}\text{RVGKIIT}^{377}$ ; (б) – амінокислотна послідовність субодиниці TyrRS (GenPept код NP\_003671.1); послідовності цитокінових мотивів виділено чорним кольором. Ділянки, для яких не встановлено атомних координат у кристалографічних структурах (PDB коди: 1N3L, 1Q11, 1NTG), виділені сірим кольором. Послідовність, що належить до CP1-вставки, виділено рамкою чорного кольору



Побудовані моделі мономерів були охарактеризовані одночасно за чотирма оціночними функціями програми Modeller: Discrete Optimized Protein Energy (DOPE), Modeller Objective Function (molpdf), Normalized DOPE score і Mol\_pct\_rank, а також за сумарними показниками оцінки геометричної коректності (Mol\_pct\_rank) веб-серверу MolProbity. Відібрано 10 кращих структур, які використано для подальшої роботи (таблиця 1). Найкращою із 10 відібраних структур за оціночними показниками обрано структуру № 3, яка в подальшому використана для розрахунків молекулярної динаміки. Окрім найкращих показників аналізу Molpdf, DOPE і Normalized DOPE від Modeller, структура № 3 (рис. 2) відповідає кращим оцінкам MolProbity Score зі значенням – 92/100 та конформаційних карт Рамачандрана – 97,72%.

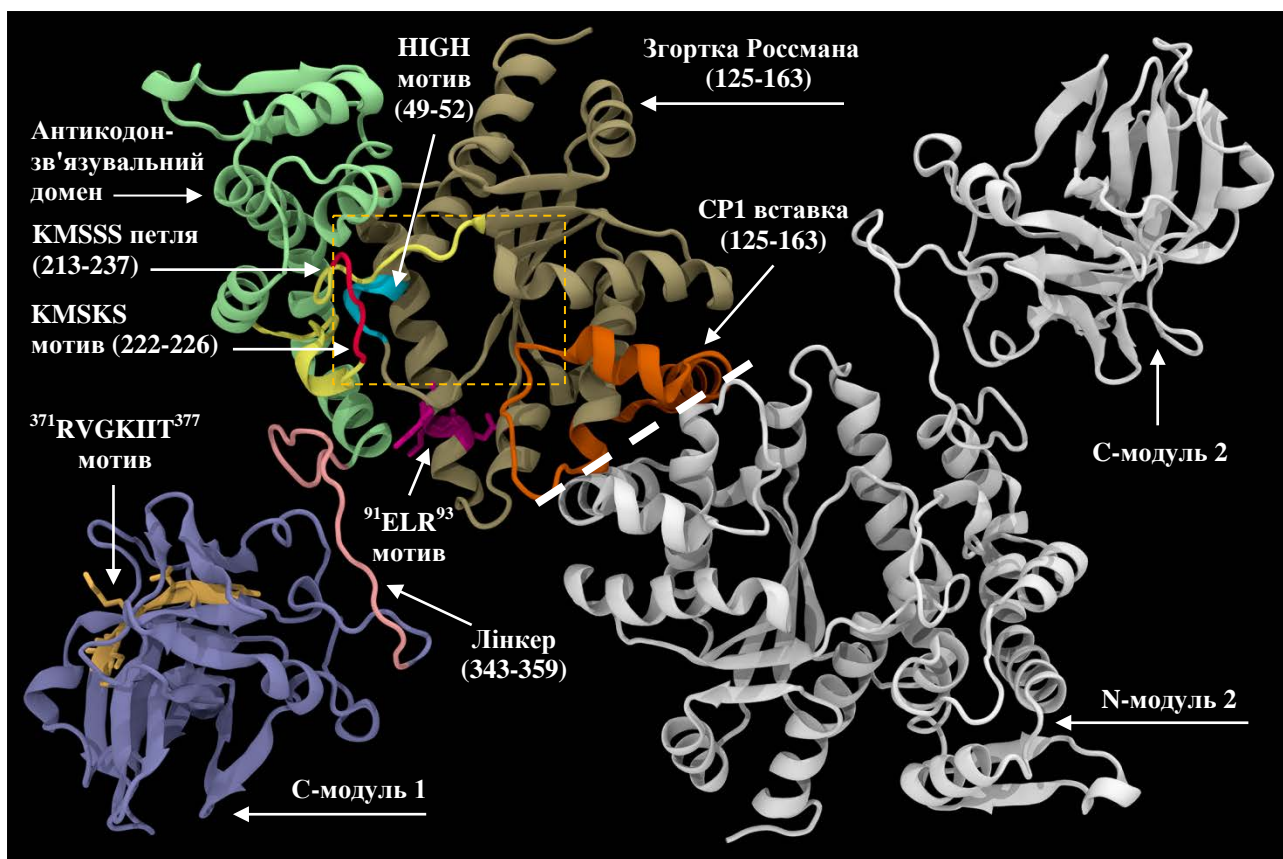
Таблиця 1.

**Характеристики десяти структур, які використані як початкові у дослідженнях методом NIEROT. Значення оціночних показників Modeller (менше – краще) та MolProbity (більше – краще) показані для одного з мономерів**

Номер структури	Molpdf (умовні од.)	DOPE (умовні од.)	Normalized DOPE (умовні од.)	MolProbity Score	Радіус гірації*, нм
1	2513,18	-59421,80	-1,04	76	3,79
2	2419,23	-59379,84	-1,03	85	4,16
3	2188,63	-59468,36	-1,04	92	4,25
4	2208,57	-59350,75	-1,03	90	5,17
5	2699,56	-59232,81	-1,01	79	4,27
6	2616,82	-59199,10	-1,01	81	4,22
7	2690,47	-59098,57	-1,00	83	4,32
8	2455,57	-59026,08	-0,99	87	3,89
9	2449,47	-58922,91	-0,97	91	3,85
10	2476,73	-58806,62	-0,96	76	6,05

\*Примітка. Значення радіусу гірації наведено для гомодимерів

**Розробка підходів для розрахунків молекулярної динаміки та аналізу траєкторій із використанням грід-технологій.** Нашим авторським колективом створено віртуальну організацію (VO:moldyngrid), метою якої є розробка ефективної грід-інфраструктури для проведення розрахунків молекулярної динаміки біологічних макромолекул (протеїнів, нуклеїнових кислот та їхніх комплексів) у водно-іонному оточенні методами *in silico*.



**Рис. 2.** Структурні елементи моделі просторової структури димера *HsTyrRS*. Жовтим пунктиром виділено зону активного центру, білим пунктиром – інтерфейс димеризації

Це дало змогу ефективно використовувати обчислювальні ресурси Українського національного ґрід-інфраструктури (<http://ung.in.ua/>) та Європейської ґрід-інфраструктури (<https://www.egi.eu/>) (рис. 3).

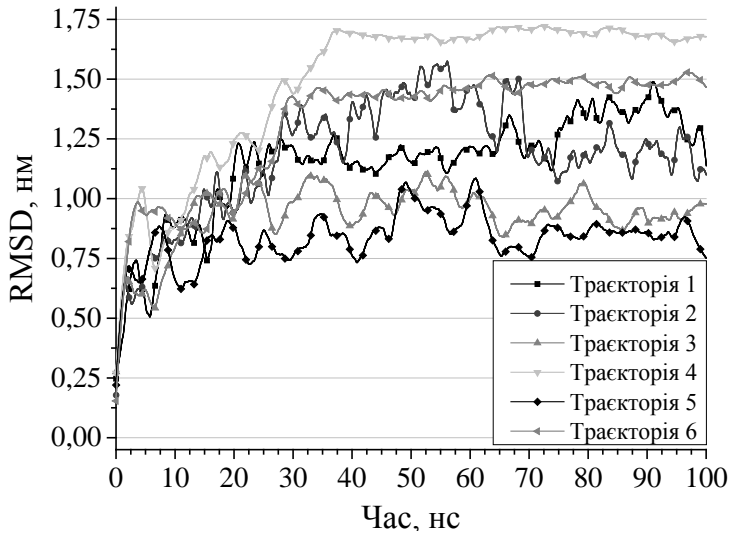


**Рис. 3.** Обчислювальні ресурси віртуальної лабораторії MolDynGrid. Станом на 2016 рік під'єднано 9 ресурсних центрів загальною кількістю ~2500 процесорних ядер, з яких 2 кластера належать до EGI: Leibniz-Rechenzentrum Linux-Cluster (Німеччина) та EGI Federated Cloud (федеративний “хмарний” ресурсний центр) з графічними прискорювачами

**Дослідження молекулярної динаміки *HsTyrRS* у вільному стані.** Детальне вивчення молекулярної динаміки *HsTyrRS* є актуальним, оскільки дозволяє зрозуміти молекулярні механізми функціонування ферменту та може

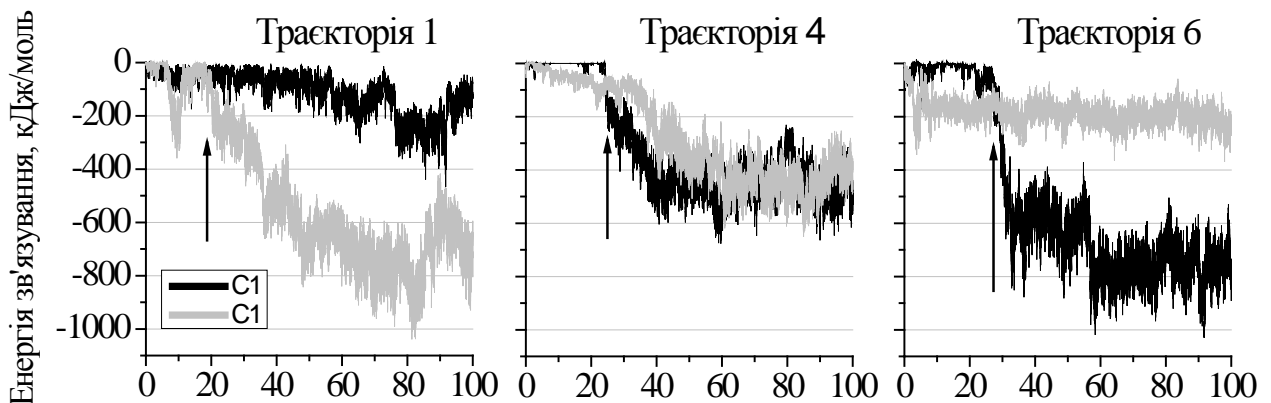
сприяти вивченню механізмів патогенезу її мутантних форм, що призводять до нейродегенеративних захворювань (Li *et al.*, 2015, Storkebaum, 2016).

Проведено розрахунки молекулярної динаміки *HsTyrRS* у водно-іонному оточенні у часовому інтервалі 100 нс. Для отриманих траєкторій МД *HsTyrRS* проаналізовано середньоквадратичні відхилення (RMSD) за  $C\alpha$  атомами (рис. 4). Показано, що період релаксації для повнорозмірної *HsTyrRS* відповідає першим 40 нс, що було враховано під час аналізу траєкторій.



**Рис. 4.** Середньоквадратичні відхилення (RMSD) за  $C\alpha$  атомами для шести траєкторій молекулярної динаміки повнорозмірної *HsTyrRS*. Перші 40 нс відповідають періоду релаксації

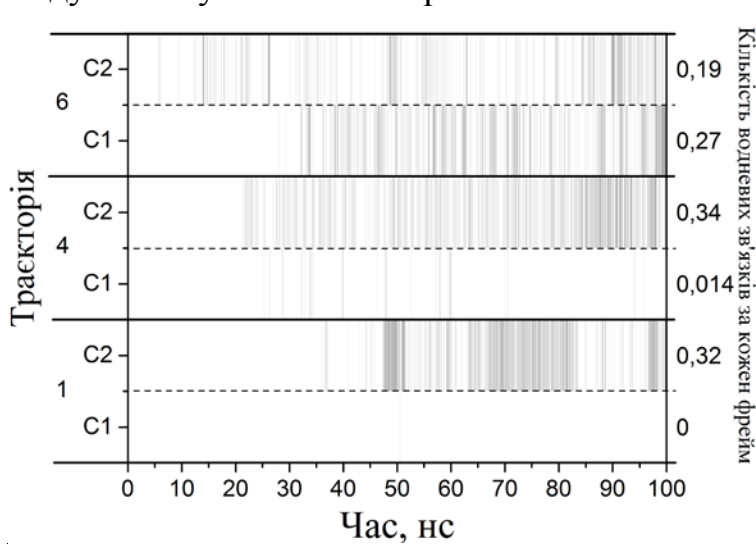
Аналіз траєкторій молекулярної динаміки *HsTyrRS* вказує на формування компактних структур, в яких С-модулі взаємодіють з димером N-модулів, екрануючи їх. Спостерігається виражена асиметрія у зв'язуванні С-модулів (рис. 5), що пояснюється їхніми незалежними конформаційними рухами у кожному мономері фермента.



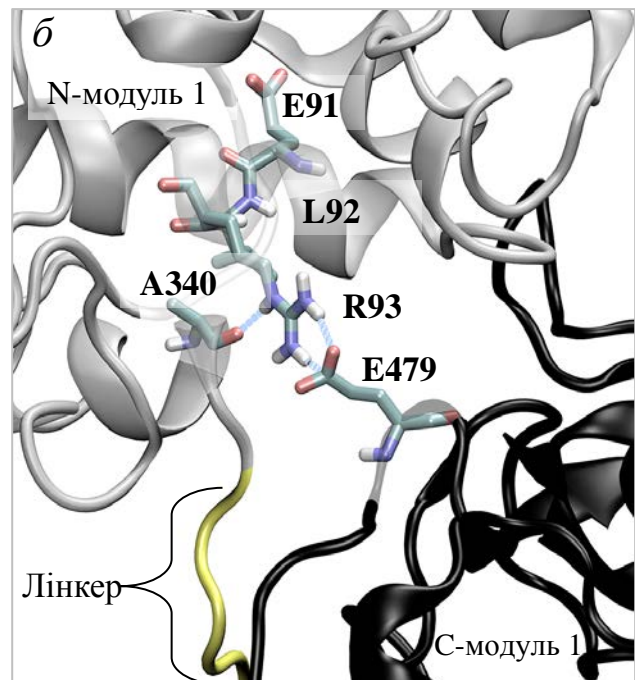
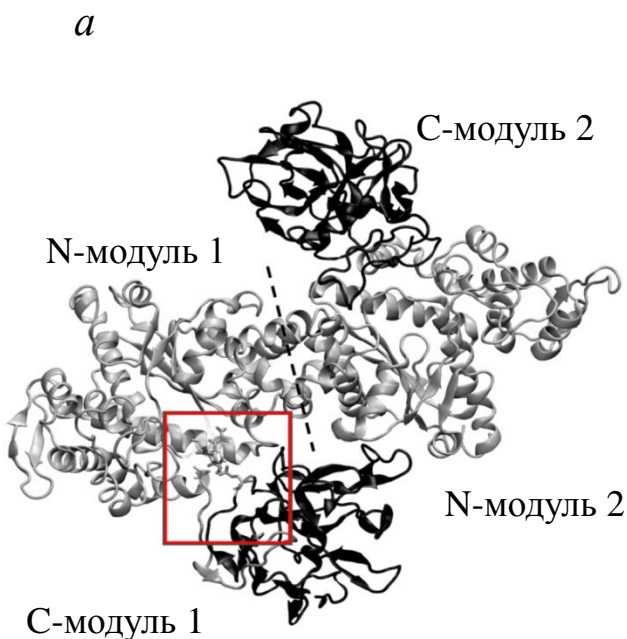
**Рис. 5.** Енергії зв'язування С-модулів з димером N-модулів для трьох обраних траєкторій молекулярної динаміки

Для підтвердження асиметрії зв'язування проаналізовано енергії зв'язування між кожним С-модулем та димером N-модулів. Найнижчі значення енергій (нижче – краще) на рівні -1000 кДж/моль спостерігаються при взаємодії N-кінцевих модулів з С2-модулем для траєкторії 1 та при взаємодії N-кінцевих модулів з С1-модулем для траєкторії 6.

**Аналіз стану цитокинового ELR-мотиву в *HsTyrRS*.** Дані молекулярної динаміки *HsTyrRS* були проаналізовані на наявність водневих зв'язків між цитокиновим ELR-мотивом (залишки E91-R93 N-модуля) і С-модулем (залишки D343-S528). Встановлено, що ELR-мотив утворює водневі зв'язки з С-модулем в трьох з шести траєкторій молекулярної динаміки. Зміну кількості водневих зв'язків у структурах для 3 обраних траєкторій показано на рис. 6, а формування водневих зв'язків в структурі повнорозмірного димера між ELR-мотивом і С-модулем візуалізовано на рис. 7.



**Рис. 6.** Еволюція водневих зв'язків між ELR-мотивом (залишки E91 – R93 в кожному з мономерів) і поверхнею окремих С-модулів з урахуванням міжмодульного лінкера (залишки D343 – S528)

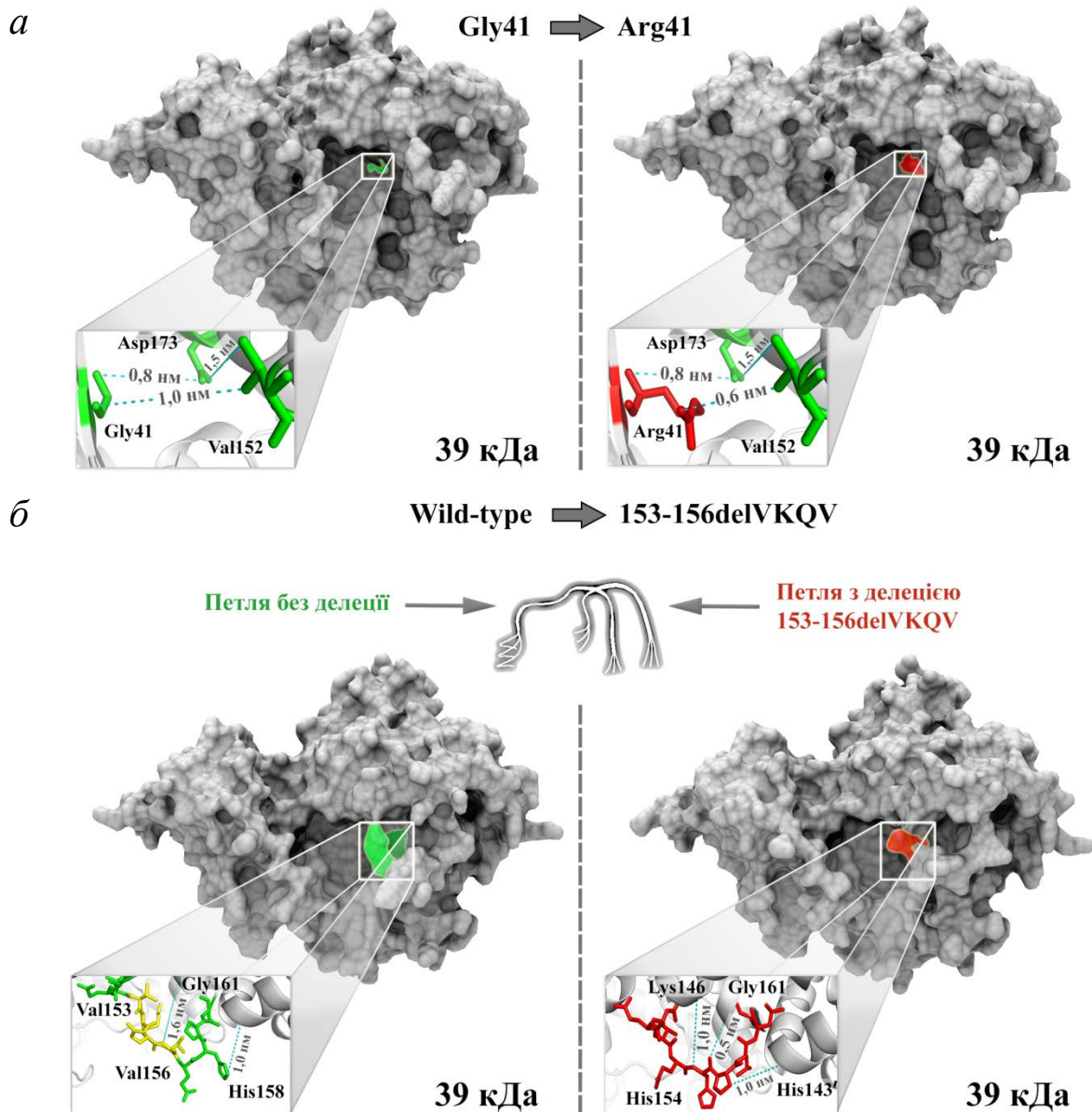


**Рис. 7.** Конфігурація водневих зв'язків між ELR-мотивом N-модуля і С-модулем в *HsTyrRS* (траєкторія 6, конформація при 96 нс): (*a*) – повнорозмірна структура димера *HsTyrRS*; (*б*) – ділянки взаємодії цитокинового ELR мотиву. N-модулі зображено сірим кольором, С-модулі – чорним. Водневі зв'язки показані пунктиром. Пунктирна лінія показує орієнтовний сайт димеризації N-модулів



Водневі зв'язки між залишками R93 і Q476 другого мономеру, що відносяться до N- і С-кінцевих модулів відповідно, були присутні на протязі 32% часу моделювання молекулярної динаміки. В структурі синтетази, що відповідає траєкторії 4, водневі зв'язки утворюються між залишками R93 і E473 другого мономера протягом 34% часу. В структурі синтетази, що відповідає траєкторії 6, водневі зв'язки існували до 46% часу (27% у першому мономері і 19% у другому мономері) між залишками R93 і Q476 та E479.

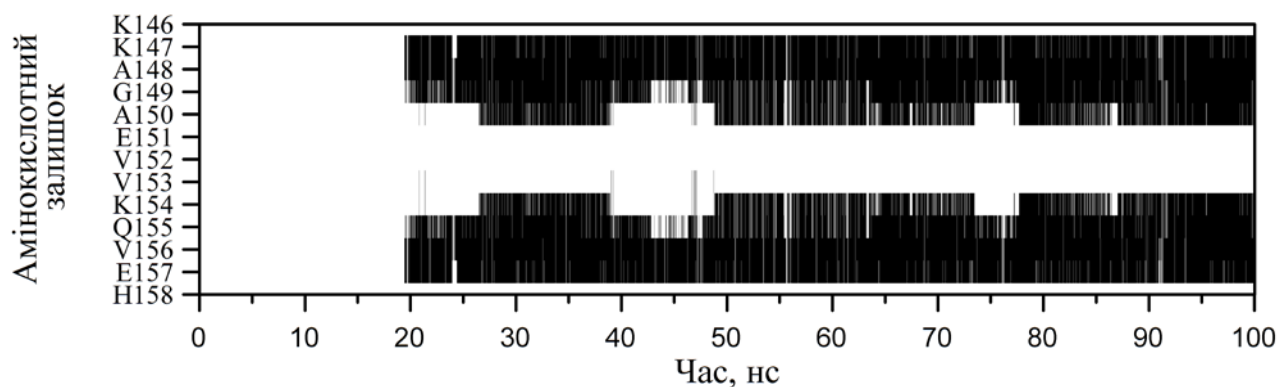
**Комп'ютерне моделювання просторових структур мутантних форм *HsTyrRS*, пов'язаних з нейропатією DI-CMTC.** Структурні координати мутантних форм *HsTyrRS*, пов'язаних з нейропатією DI-CMTC, досі невідомі: тому для отримання їхніх структурних моделей застосовано метод молекулярного моделювання (рис. 8).



**Рис. 8.** Моделювання просторових структур мутантних форм *HsTyrRS*: (а) – локалізація сайту мутації G41R; (б) – локалізація сайту мутації 153-156delVKQV

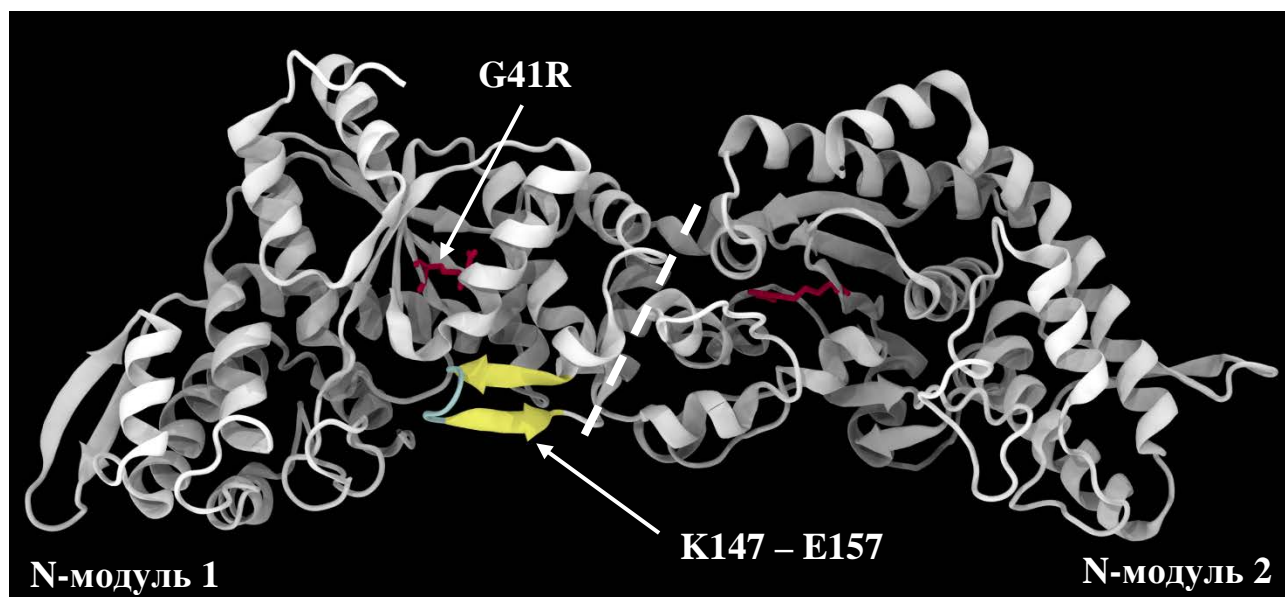
**Комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки мутантної форми G41R *HsTyrRS*.** Для структур міні-TyrRS людини та її мутантної форми G41R успішно виконано стадії мінімізації та врівноваження у водно-іонному оточенні. Отримано траєкторії молекулярної динаміки міні-*HsTyrRS* та її мутантної форми G41R в інтервалі 100 нс. Виявлено шість амінокислотних залишків, які формують водневі зв'язки з Arg41 з тривалістю існування більше 10% від загального часу динаміки для 100 нс траєкторії: Tyr39 – 62%, Gln188 – 22%, His77 – 18%, Tyr123 – 18%, Asp173 – 17% і Gln170 – 13%. Амінокислотні залишки Tyr39, Gln170 і Asp173 належать до активного центру ферменту, приймають участь у зв'язуванні з L-тирозином (Sajish & Schimmel, 2015) та належать до еволюційно консервативних – 9/9 (за даними баз веб-сервера ConSurf). Таким чином, виявлене утворення зазначених водневих зв'язків з Arg41 може пояснювати молекулярний механізм порушення взаємодії L-тирозиону з активним центром у мутантної форми G41R *HsTyrRS*.

Аналіз змін вторинної структури в процесі молекулярної динаміки (DSSP, Define Secondary Structure of Proteins) мутантної форми G41R *HsTyrRS* виявив формування метастабільної  $\beta$ -структури (тривалість існування 80%) в одній з субодиниць димера ензиму, до якої входять залишки Lys147 – Glu157, що локалізовані біля інтерфейсу димера і входять до складу петлі CP1-вставки згортки Россмана (рис. 9). При цьому виявлено формування водневих зв'язків між  $\beta$ -структурою Lys147 – Glu157 і амінокислотним залишком каталітичної петлі (тривалість існування більше 10%): Ser225 – 24% та із залишками Lys190 – 51% і Thr193 – 15%, які належать до H11  $\alpha$ -спіралі, що формує водневі зв'язки з Arg41 (Gln188 – 22%).



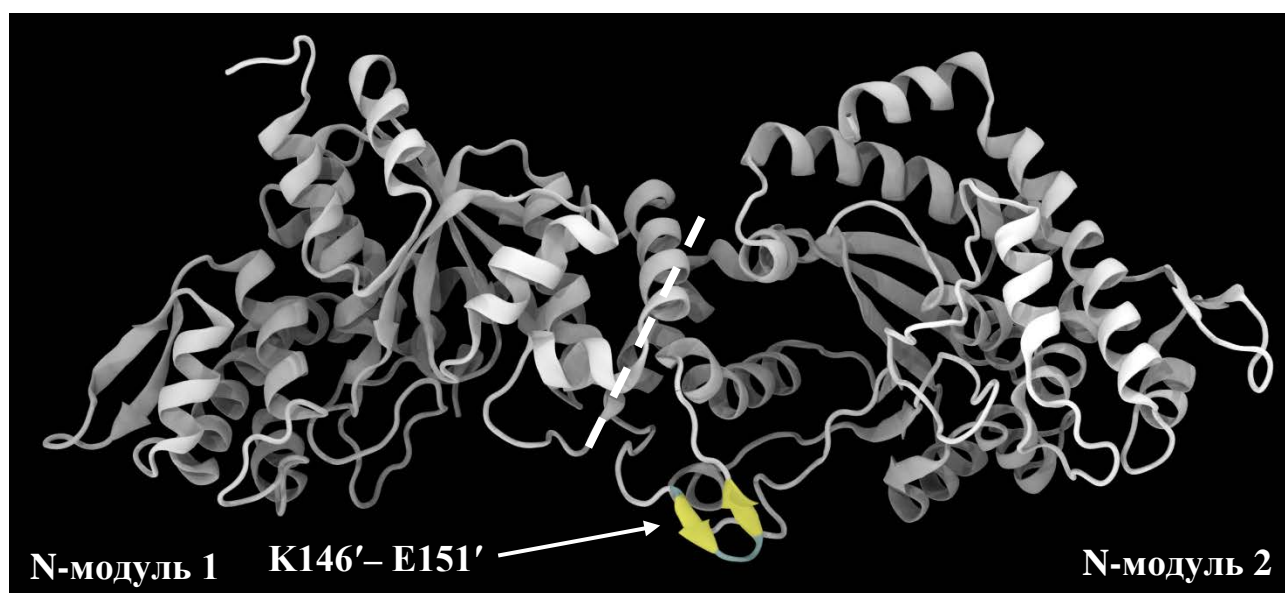
**Рис. 9.** Карта змін вторинної структури DSSP для траєкторії мутантної форми G41R. Чорним кольором показано область формування  $\beta$ -структурного елемента в часовому інтервалі 20-100 нс (80% тривалість існування) за участю амінокислотних залишків Lys147 – Glu157

Візуалізовано структуру мутантної форми G41R *HsTyrRS* станом на 100 нс молекулярної динаміки (рис. 10).

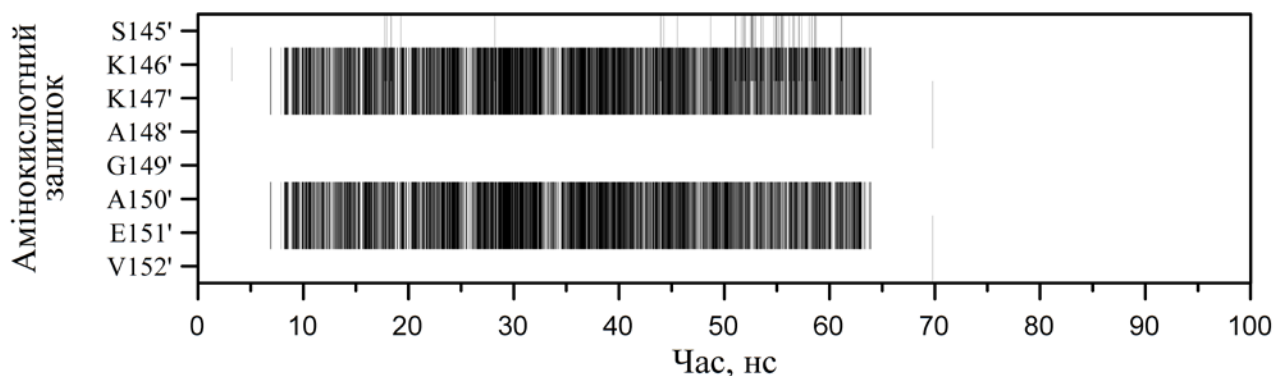


**Рис. 10.** Структура мутантної форми G41R *HsTyrRS* станом на 100 нс молекулярної динаміки. Формування антипаралельної  $\beta$ -структури K147 – E157, послідовність якої належить до неструктурованої петлі CP1-вставки, відображено жовтим кольором. Формування  $\beta$ -структурного елемента спостерігається тільки в одному із каталітичних модулів (N1)

**Молекулярна динаміка мутантної форми del153-156VKQV.** Для структури мутантної форми del153-156VKQV виконані стадії мінімізації та врівноваження макромолекул ферменту у водно-іонному оточенні. Проведено розрахунки молекулярної динаміки мутантної форми del153-156VKQV тривалістю 100 нс. Виявлено формування нового  $\beta$ -структурного елемента (рис. 11), що підтверджує аналіз змін вторинної структури (DSSP) (рис. 12).



**Рис. 11.** Структура мутантної форми del153-156VKQV *HsTyrRS* станом на 63 нс молекулярної динаміки. Формування антипаралельної  $\beta$ -структури K146' – E151', послідовність якої належить до CP1-вставки, відображено жовтим кольором. Формування  $\beta$ -структурного елемента спостерігається тільки в одному мономері (N2)



**Рис. 12.** Карта вторинної структури DSSP для мутантної форми del153-156VKQV. Чорним кольором показано область формування  $\beta$ -структурного елемента в період 5-65 нс (38% тривалість існування) за участю амінокислотних залишків K146' – E151'

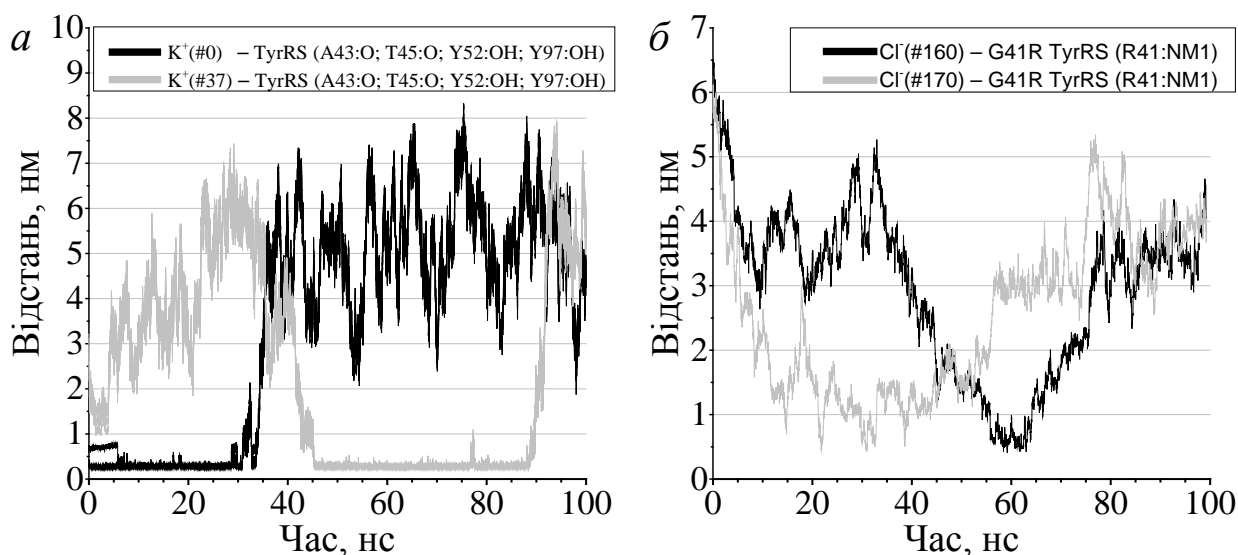
Формування метастабільної  $\beta$ -структури, до якої входять залишки S145 – V152 (38% тривалість існування, із 5 по 65 нс) спостерігається в одній з субодиноць димера ензиму в ділянці, що входять до складу CP1-вставки згортки Россмана. Встановлено, що молекулярна динаміка мутантної форми del153-156VKQV *HsTyrRS* супроводжується плавленням  $\alpha$ -спіралі H9 (T141-A148).

**Розробка моделі впливу мутацій DI-СМТС на взаємодії між *HsTyrRS* та її субстратами.** Станом на сьогодні, структурні координати повнорозмірних *TyrRS* ссавців з низькомолекулярними субстратами та тРНК відсутні. Побудова комплексів з субстратами і проміжним продуктом тирозил-аденилатом може покращити розуміння механізму впливу різних мутацій в *HsTyrRS* та є необхідним етапом для подальших досліджень. Раніше в роботі (Froelich & First, 2011) виявлено, що мутація G41R *HsTyrRS* призводить до 100-кратного зменшення активності реакції аміноацилювання тРНК. Причиною цього можуть бути порушення зв'язування з субстратом L-тирозином. Проте, структура мутантної форми G41R *HsTyrRS* досі невідома. Водночас відомо, що мутація G526R (СМТ) в активному центрі гліцил-тРНК синтетази приводить до блокування зв'язування L-гліцину. В кристалічній структурі (PDB код: 2PMF) мутантної форми G526R *HsGlyRS* спостерігається іон хлору, який утворює координаційний зв'язок із залишком R526 (Xie *et al.*, 2007). Тобто, СГ може потрапити до активного центру через зміни в електростатичному потенціалі на молекулярній поверхні активного центру ферменту (Nangle *et al.*, 2007).

У зв'язку з цим проведено розрахунки молекулярної динаміки міні-*HsTyrRS* та її мутантної форми G41R в комплексі з L-тирозином. Необхідною умовою для каталізу тирозил-тРНК синтетази людини є наявність саме позитивно зарядженого іону калію в активному центрі, який виконує функціональну роль другого лізину в каталітичній петлі, що важливо для реакції аміноацилювання тРНК (Austin & First, 2002a, b, c) (рис. 13).

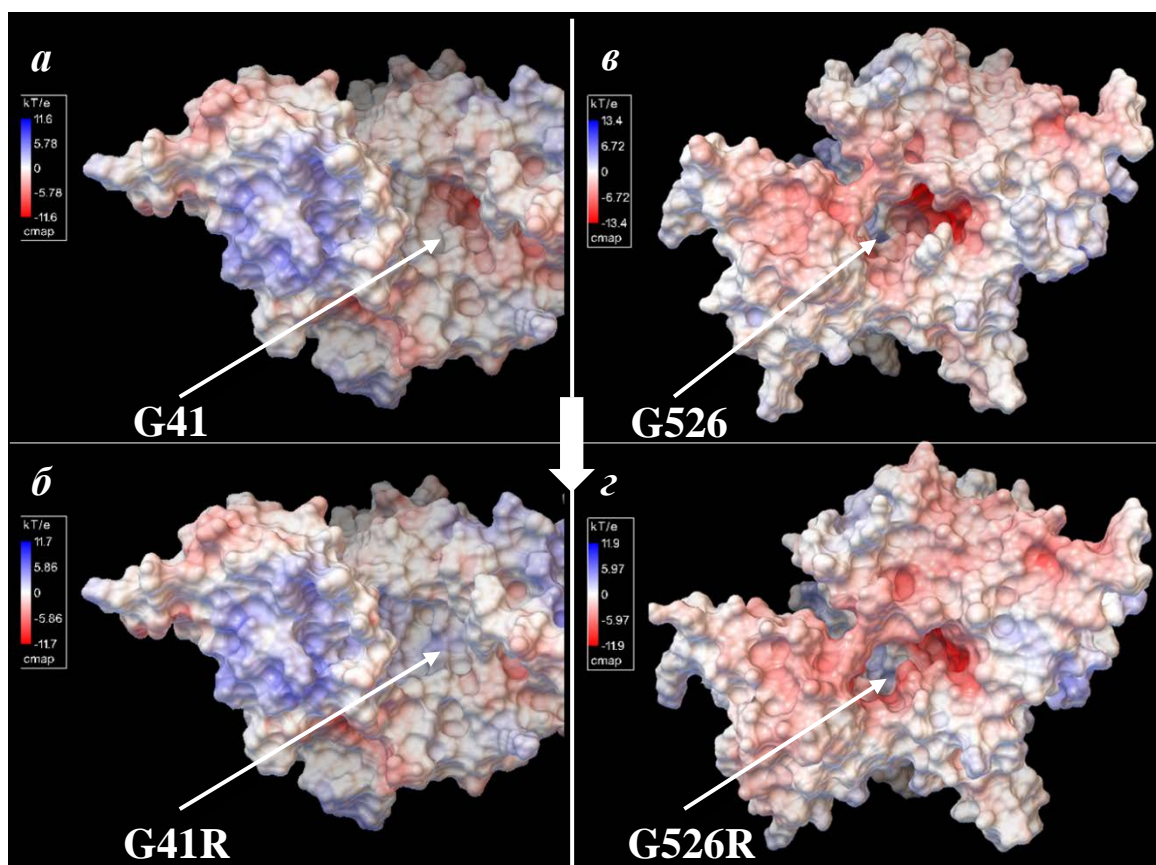
Результати аналізу підтверджують можливість взаємодії СГ з мутантним залишком Arg41 в структурі мутантної форми G41R *HsTyrRS* та узгоджується з експериментами для схожої мутантної форми G526R *HsGlyRS* (Xie *et al.*, 2007).





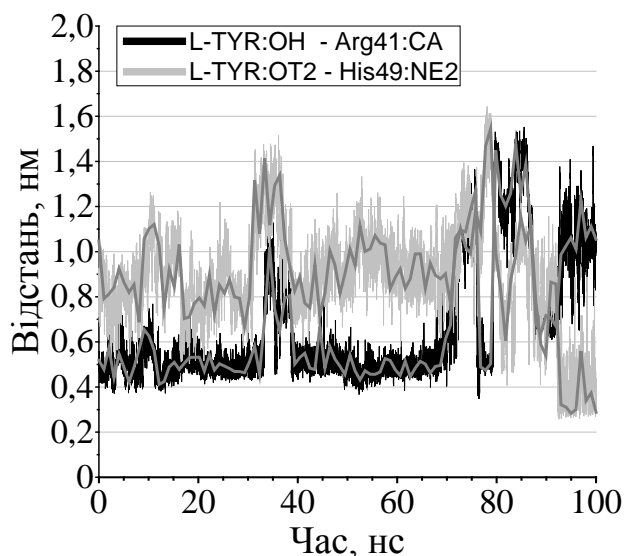
**Рис. 13.** (а) – відстань між іонами калію та залишками активного центру; (б) – відстань між іонами хлору та залишком Arg41 в структурі мутантної форми G41R *HsTyrRS*

Цю взаємодію можна пояснити формуванням позитивно зарядженої молекулярної поверхні в активних центрах для обох мутантів (рис. 14): G41R і



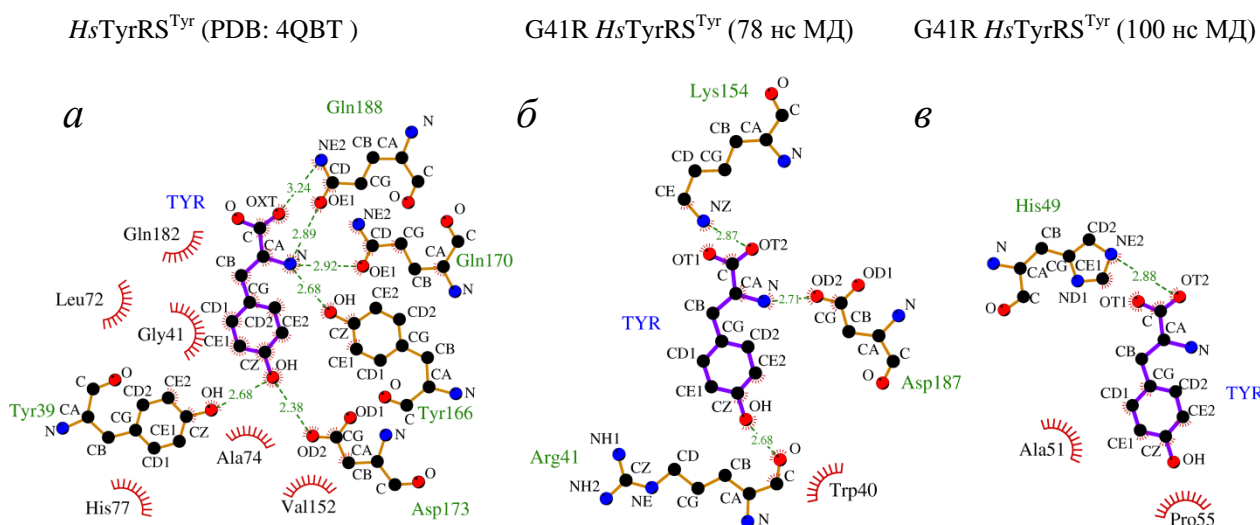
**Рис. 14.** Візуалізація результатів аналізу APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver). Виявлені зміни електростатичного потенціалу на молекулярній поверхні: активного центру *HsTyrRS* дикого типу (а); активного центру мутантної форми G41R *HsTyrRS* (б); активного центру *HsGlyRS* дикого типу (в) та активного центру мутантної форми G526R *HsGlyRS* (г)

G526R (~ 20% площі). Для ферменту дикого типу взаємодії активного центру з іонами хлору відсутні – натомість спостерігаються координаційні зв'язки з іоном калію, що є типовим для *HsTyrRS*. Спостерігається зміна локалізації L-тирозину в активному центрі (рис. 15).



**Рис. 15.** Відстань між ОН-групою L-тирозину і Ca атомом мутантного залишку G41R в процесі МД відображено чорним кольором. Відстань між атомом кисню L-тирозина і атомом азоту NE2 залишком His49, що належить до HIGH-подібного мотиву *HsTyrRS*, відображено сірим кольором

Порівняння оточення L-тирозину в активному центрі *HsTyrRS* за різних часових станів відображено на рис. 16.



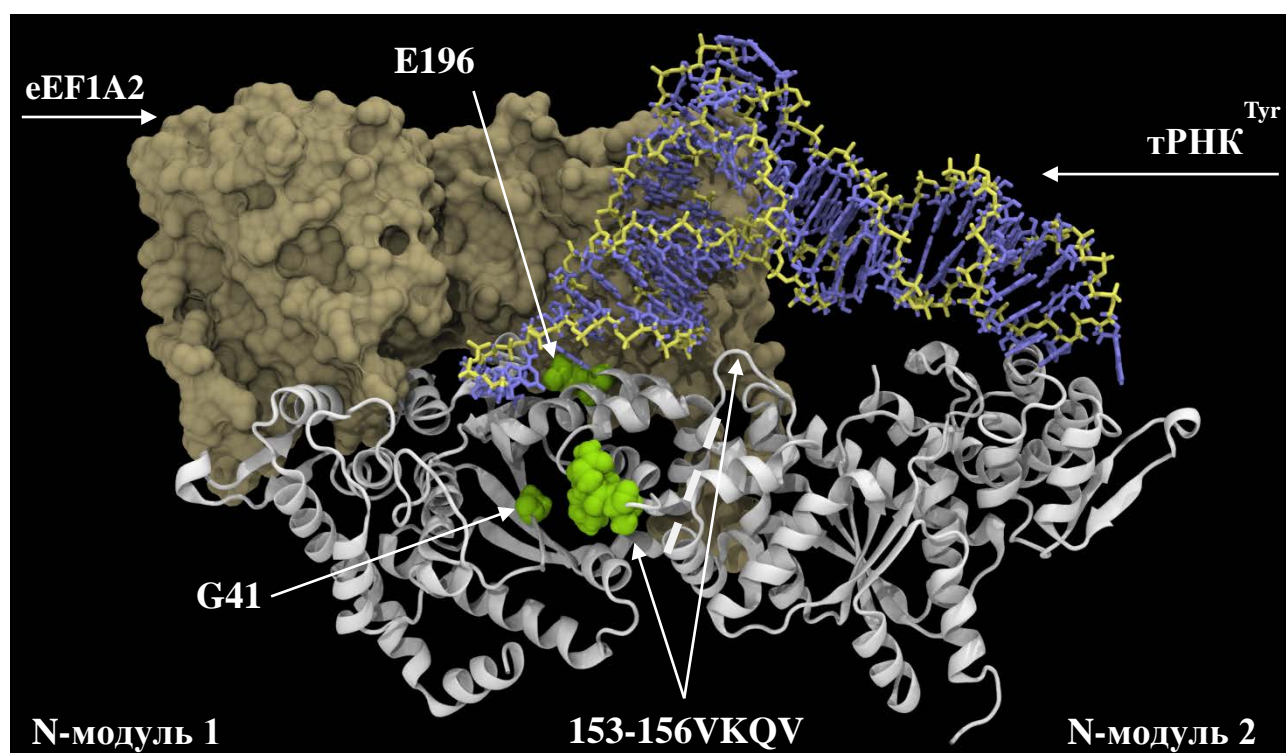
**Рис. 16.** Схематичне представлення водневих зв'язків між субстратом L-тирозином та активним центром міні-*HsTyrRS* за різних часових станів: (*a*) – оточення L-тирозину за даними кристалографічної структури (PDB: 4QBT); (*б*) – оточення L-тирозину станом на 78 нс молекулярної динаміки; (*в*) – оточення L-тирозину станом на 100 нс молекулярної динаміки

Аналіз водневих зв'язків між субстратом L-тирозином і залишками G41R *HsTyrRS* у траєкторії МД в часовому інтервалі 0 – 80 нс показав таку тривалість існування зв'язків (> 10%): Gln170 – 62%, Asp187 – 61%, Lys154 – 15%. Формування водневих зв'язків у часовому інтервалі 80 – 100 нс: His49 – 20%, Tyr97 – 20%, Asp187 – 20%, Tyr52 – 10%, вказує на зміну локалізації L-тирозину в процесі молекулярної динаміки на сайт, де розташовується АТР в активному центрі G41R *HsTyrRS*.

Виявлено формування водневих зв'язків між L-тирозином та His49, який належить до консервативного залишку каталітичного HIGH-мотиву, що може призводити до блокування взаємодії молекули АТФ з активним центром синтетази.

**Побудова моделі просторової структури комплексу *HsTyrRS* з тРНК<sup>Tyr</sup> та eEF1A2.** Евкаріотичний фактор елонгації (eEF1A) представлений двома ізоформами. Для моделювання обрано ізоформу eEF1A2, яка локалізована переважно в м'язових і нейрональних тканинах, на відміну від ізоформи A1.

Для кращого розуміння локалізації сайтів мутацій DI-СМТС побудовано структурний комплекс *HsTyrRS*\*тРНК<sup>Tyr</sup>\*eEF1A2, який відображено на рис. 17.



**Рис. 17.** Локалізація сайтів мутацій G41R, E196K і делеції 153-156delVKQV на моделі комплексу міні-*HsTyrRS* з відповідною тРНК<sup>Tyr</sup> та фактором елонгації eEF1A2

Після аналізу отриманого структурного комплексу стало очевидним, що сайт мутації E196K розташований під першою нуклеотидною парою акцепторного стебла тРНК<sup>Tyr</sup> (C1:G72), що відповідає за специфічність розпізнавання тРНК<sup>Tyr</sup> евкаріотичною TyrRS. В той же час, на відстані 0,5 нм локалізовано домен II фактору елонгації eEF1A2 в побудованому комплексі. Виявлено, що неструктурована петля CP1 вставки *HsTyrRS* формує водневі зв'язки з тРНК<sup>Tyr</sup>, що може мати суттєвий вплив у випадку її укорочення у мутантної форми 153-156delVKQV.

Відомо, що *HsTyrRS* широко розповсюджена у головному і спинному мозку, розміщуючись вздовж моторних нейронів і в філоподіях, та проявляє специфічну роль у нейрональних закінченнях (Nangle *et al.*, 2007). Тому формування структурного комплексу *HsTyrRS* з eEF1A2 є досить ймовірним.

Отримані результати моделювання потрійного комплексу *HsTyrRS* з тРНК<sup>Tyr</sup> та фактором елонгації eEF1A2 підтримують гіпотезу, що загальним молекулярним механізмом патогенезу для всіх трьох мутацій Шарко-Марі-Туса можуть бути порушення міжмолекулярних взаємодій, а саме інтерфейсу між *HsTyrRS* і тРНК<sup>Tyr</sup> та/або з фактором елонгації eEF1A2.

## ВИСНОВКИ

Конформаційна рухливість тирозил-тРНК синтетази *H. sapiens* та її комплексів з субстратами вивчена методами комп'ютерного моделювання молекулярної динаміки. Для мутантних форм синтетази, пов'язаних з нейропатією Шарко-Марі-Туса, виявлені конформаційні зміни, які можуть призводити як до змін конформації активного центру, так і до змін специфічних взаємодій з тРНК<sup>Tyr</sup> та фактором елонгації eEF1A2.

1. Виконано комп'ютерне моделювання просторової структури повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази *H. sapiens*, її комплексів із субстратами і мутантних форм, що асоційовані з нейропатією Шарко-Марі-Туса.

2. Для підвищення продуктивності розрахунків молекулярної динаміки створено віртуальну лабораторію MolDynGrid, що функціонує в рамках Українського національного ґрід-ресурсу для вирішення задач в галузях структурної біології і біоінформатики, які потребують значних витрат машинного часу та оперують великими об'ємами інформації.

3. Виконано комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки повнорозмірної *HsTyrRS* в діапазоні 100 нс із застосуванням ґрід-технологій. Дослідження молекулярної динаміки міжмодульного лінкера *HsTyrRS* показало формування динамічних елементів вторинної структури. Показано формування асиметричної компактної структури *HsTyrRS*, в якій цитокіновий ELR-мотив є екранованим у результаті взаємодії з С-модулем, що підтверджує гіпотезу Шиммеля про відсутність цитокінової активності за рахунок екранування цитокінового мотиву в повнорозмірній структурі синтетази.

4. Моделювання молекулярної динаміки мутантних форм тирозил-тРНК синтетази, пов'язаних з нейропатією Шарко-Марі-Туса, показало наявність локальних конформаційних змін в неструктурованій петлі CP1-вставки згортки Россмана, які супроводжуються формуванням метастабільних  $\beta$ -структурних елементів (K147 – E157).

5. Аналіз траєкторії молекулярної динаміки структурного комплексу *HsTyrRS*\*тРНК<sup>Tyr</sup> показав наявність водневих зв'язків, які підтверджують участь амінокислотних залишків петлі CP1 вставки у взаємодії з відповідною тРНК<sup>Tyr</sup>. Формування метастабільних  $\beta$ -структурних елементів у цій ділянці може призводити до порушень у розпізнаванні акцепторним стеблом відповідної тРНК. В процесі динаміки спостерігається вихід L-тироzinу з активного центру мутантної форми G41R *HsTyrRS*, що може призводити до порушення реакції аміноацилювання.



6. Побудовано комп'ютерну модель потрійного комплексу *HsTyrRS* з тРНК<sup>Tyr</sup> та фактором елонгації eEF1A2. На основі цієї моделі запропоновано механізм впливу мутацій Шарко-Марі-Туса на взаємодію з її макромолекулами-партнерами. Висловлено припущення, що виявлені конформаційні ефекти можуть призводити як до зміни конформації активного центру, так і до зміни специфічних взаємодій мутантних форм *HsTyrRS* з фактором елонгації eEF1A та/або тРНК<sup>Tyr</sup>.

## ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Інтегроване середовище віртуальної лабораторії MolDynGrid для розрахунків молекулярної динаміки біополімерів / Сальников А.О., Судаков О.О., Савицький О.В., Слюсар Є.А., Корнелюк О.І. // Медична інформатика та інженерія. — 2010. — Т. 3, № 1, — С. 24-32. (*Особистий внесок здобувача: наповнення бази даних траєкторій МД, концепція графічного веб-інтерфейсу, залучення обчислювальних ресурсів для реплікованого зберігання траєкторій МД*)
2. Interdomain compactization in human tyrosyl-tRNA synthetase studied by the hierarchical rotations technique / Yesylevskyy S. O., Savytskyi O. V., Odynets K. A. and Kornelyuk A. I. // Biophysical Chemistry. — 2011. — V. 154, N 2-3. — P. 90-98. (*Особистий внесок здобувача: огляд літератури, побудова, аналіз, відбір кращих структурних моделей, підготовка структур для використання методу HIEROT, обговорення результатів зі співавторами*)
3. PTI-1: novel way to oncogenicity / Vislovukh A. A., Shalak V. F., Savytskyi O. V., Kovalenko N. I., Gralievskaya N. L., Negrutskii B. S. and El'skaya A. V. // Biopolym. Cell. — 2012. — V. 28, N 5. — P. 404-410. (*Особистий внесок здобувача: впровадження і адаптація алгоритмів програмного пакету Modeller 9v8 для їх ефективного використання на обчислювальному кластері ІМБіГ, апробація розпаралелювання методу молекулярного моделювання на прикладі онкогену РТІ-1, що може кодувати вкорочену форму фактора елонгації eEF1A*)
4. Asymmetric structure and domain binding interfaces of human tyrosyl-tRNA synthetase studied by molecular dynamics simulations / Savytskyi O. V., Yesylevskyy S. O. and Kornelyuk A. I. // Journal of Molecular Recognition. — 2013. — V. 26, N 2. — P. 113-20. (*Особистий внесок здобувача: огляд літератури, відбір кращої змодельованої структури HsTyrRS для методу МД, підготовка структур для використання методу МД, відбір параметрів МД, розрахунки МД в ґрид-середовищі, запропоновано і апробовано метод tRMSF для бібліотеки PTEROS, аналіз траєкторій МД, опис міжмодульних взаємодій, співставлення даних з методом HIEROT, обговорення результатів зі співавторами та підготовка роботи до друку*)
5. Комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки мутантної форми тирозил-тРНК синтетази G41R, асоційованої з нейропатією Шарко-Марі-Туса / Савицький О. В., Корнелюк О. І. // Ukrainian Biochemical Journal. — 2015. — V. 87, N 6. — P. 142-53. (*Особистий внесок здобувача: огляд*

*літератури, молекулярне моделювання мутантних форм HsTyrRS, підготовка структур для використання методу МД, підбір параметрів і розрахунок МД в ґрід, аналіз траєкторій, опис конформаційних змін в процесі МД, власноруч написано основну частину статті)*

6. Computational modeling and molecular dynamics simulations of mammalian cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase and its complexes with substrates / Kravchuk V.O., Savytskyi O.V., Odynets K.O., Mykuliak V.V. and Kornelyuk A.I. // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. — 2016. — P. 1-17. (DOI: 10.1080/07391102.2016.1235512) *(Особистий внесок здобувача: участь у обговоренні параметрів молекулярного моделювання, оптимізації структур і параметрів МД евкаріотичних TyrRS; порівняння взаємодії іонів  $K^+$  з активними центрами HsTyrRS і BtTyrRS, аналіз ролі CP1 вставки в HsTyrRS та її мутантних формах)*
7. Domain binding interfaces in human tyrosyl-tRNA synthetase studied by the hierot technique and molecular dynamics simulations / Savytskyi O.V., Yesylevskyy S.O. and Kornelyuk O.I. // Proceedings of the eSSENCE International Workshop on “Macromolecular Structure and Dynamics”, 3-5 June 2013, BMC, Uppsala, Sweden. — 2013. — V. 1, — P. 12. *(Особистий внесок здобувача: розрахунки МД в ґрід-середовищі, опис міжмодульних взаємодій, співставлення даних з методом HIEROT, обговорення результатів зі співавторами та підготовка роботи до друку)*
8. Local  $\beta$ -sheet formation in G41R mutant of human tyrosyl-tRNA synthetase associated with Charcot-Marie-Tooth disease / Savytskyi O.V., Yesylevskyy S.O. and Kornelyuk O.I. // Proceedings of the 6th Theoretical Biophysics Symposium, 24-27 June 2013, Gothenburg, Sweden. — 2013. — V. 1, — P. 13. *(Особистий внесок здобувача: молекулярне моделювання мутантних форм HsTyrRS, розрахунки МД в ґрід-середовищі, опис конформаційних змін, власноруч написано основну частину публікації)*
9. Local beta-sheet formation in 153-156delVKQV mutant of human TyrRS associated with CMT disease / Savytskyi O.V. and Kornelyuk A.I. // European Biophysics Journal. — 2013. — V. 42, N S1. — P. S198. *(Особистий внесок здобувача: молекулярне моделювання мутантних форм HsTyrRS, розрахунки МД в ґрід-середовищі, опис конформаційних змін, власноруч написано основну частину публікації)*
10. Conformational changes in human tyrosyl-tRNA synthetase studied in the moldyngrid virtual laboratory / Savytskyi O.V., Sliusar I.A., Salnikov A.O., Yesylevskyy S.O. and Kornelyuk A.I. // Proceedings of the International Conference "NORDUGRID-2013: Distributed systems and Big Data – towards new horizons", 4-6 June 2013, Šiauliai, Lithuania. — 2014. — V. 1, — P. 20-21. *(Особистий внесок здобувача: розрахунки МД в ґрід-середовищі, опис конформаційних змін, власноруч написано основну частину публікації)*
11. Conformational flexibility and domain binding interfaces in human tyrosyl-tRNA synthetase studied by molecular dynamics simulations / Savytskyi O.V., Yesylevskyy S.O. and Kornelyuk O.I. // FEBS JOURNAL. — 2014. — V. 281, — P. 621. *(Особистий внесок здобувача: розрахунки МД в ґрід-середовищі,*

*аналіз траєкторій та опис конформаційних змін, власноруч написано основну частину публікації)*

12. Molecular dynamics of human tyrosyl-tRNA synthetase active center in the complex with tyrosyl-adenylate / Savytskyi O.V. and Kornelyuk O.I. // Ukr.Biochem.J. — 2014. — V. 86, N 5 (Suppl. 1). — P. 77-78. *(Особистий внесок здобувача: молекулярне моделювання структурних комплексів з субстратами, розрахунки МД в грід-середовищі, опис конформаційних змін, власноруч написано основну частину публікації)*
13. Molecular dynamics simulations of tyrosyl-tRNA synthetase mutant forms associated with Charcot-Marie-Tooth neuropathy / Savytskyi O.V. and Kornelyuk O.I. // Proceedings of the FEBS/IUBMB Advanced Lecture Course "Molecular basis of human diseases: 50 years anniversary of Spetses summer schools", 27th May - 1st June, 2016, Spetses island, Greece. — 2016. — V. 1, — P. 41. *(Особистий внесок здобувача: молекулярне моделювання мутантних форм HsTyrRS, розрахунки МД в грід-середовищі, опис конформаційних змін, власноруч написано основну частину публікації)*
14. MolDynGrid virtual laboratory as a part of Ukrainian Academic Grid infrastructure / Salnikov A. O., Sliusar I. A., Sudakov O. O., Savytskyi O. V. and Kornelyuk A. I. // Proceedings of the 5th IEEE International Workshop on Intelligent Data Acquisition and Advanced Computing Systems: Technology and Applications, IDAACS 2009. — 2009. — V. 1, — P. 237-240. *(Особистий внесок здобувача: аналіз засобів з автоматизації методу МД in silico, обробки та зберігання траєкторій, запропоновано концепцію графічного інтерфейсу блоків веб-порталу віртуальної лабораторії MolDynGrid)*
15. Virtual laboratory MolDynGrid as a part of scientific infrastructure for biomolecular simulations / Salnikov A., Sliusar I., Sudakov O., Savytskyi O. and Kornelyuk A. // International Journal of Computing. — 2010. — V. 9, N 4. — P. 294-300. *(Особистий внесок здобувача: запропоновано структуру блоків веб-порталу, апробація впровадженної системи автоматизації постановки завдань та інших модулів веб-порталу і застосунку moldynsub\_CLI, аналіз ефективності мережевого інтерконекту Infiniband для задач в GROMACS, результати якого впроваджено на кластері ІМБІГ, залучення обчислювальних ресурсних центрів для MolDynGrid)*
16. Integrated tools for molecular dynamics simulation data analysis in the MolDynGrid virtual laboratory / Savytskyi O.V., Sliusar I.A., Yesylevskyy S.O., Stirenko S.G. and Kornelyuk A.I. // Proceedings of the 6-th IEEE International Conference on Intelligent Data Acquisition and Advanced Computing Systems: Technology and Applications, IDAACS 2011. — 2011. — V. 1, — P. 209-211. *(Особистий внесок здобувача: аналіз засобів з аналізу траєкторій МД та її автоматизації; створення застосунку автоматизації аналізу траєкторій – DAS, оновлення апаратної інфраструктури кластера ІМБІГ, залучення обчислювальних ресурсів з графічними прискорювачами для розрахунку МД, підготовка роботи до друку)*

## АНОТАЦІЯ

**Савицький О.В. Комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки *H. sapiens* тирозил-тРНК синтетази та її мутантних форм". – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія. – Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, м. Київ, 2017.

Дисертацію присвячено дослідженню молекулярної динаміки *H. sapiens* тирозил-тРНК синтетази (*HsTyrRS*) та її мутантних форм у водно-іонному оточенні з використанням ґрид-технологій. Вперше побудована модель структури повнорозмірної *HsTyrRS*, для якої показано формування асиметричної компактної структури *HsTyrRS*, в якій цитокіновий ELR-мотив є екранованим в результаті взаємодії з С-модулем. Проведено комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки мутантних форм тирозил-тРНК синтетази, пов'язаних з нейропатією Шарко-Марі-Туса, виявлено локальні конформаційні зміни в неструктурованій петлі CP1-вставки згортки Россмана, які супроводжуються формуванням метастабільних  $\beta$ -структурних елементів. На основі побудованої моделі комплексу *HsTyrRS* з тРНК<sup>Tyr</sup> та фактором елонгації eEF1A2 запропоновано механізм впливу мутацій Шарко-Марі-Туса на взаємодію з її макромолекулами-партнерами. Висловлено припущення, що виявлені конформаційні ефекти можуть призводити як до зміни конформації активного центру, так і до зміни специфічних взаємодій мутантних форм з фактором елонгації eEF1A або/та тРНК<sup>Tyr</sup>.

**Ключові слова:** тирозил-тРНК синтетаза,  $\beta$ -структура, молекулярна динаміка, DI-СМТС, CP1 вставка, ELR-мотив, eEF1A, moldyngrid.

## АННОТАЦИЯ

**Савицкий А.В. Компьютерное моделирование молекулярной динамики *H. sapiens* тирозил-тРНК синтетазы и ее мутантных форм". – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 – молекулярная биология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, г. Киев, 2017.

Диссертация посвящена исследованию молекулярной динамики *H. sapiens* тирозил-тРНК синтетазы (*HsTyrRS*) и ее мутантных форм в водно-ионном окружении с использованием ґрид-технологий. Впервые построена модель структуры полноразмерной *HsTyrRS*, для которой показано формирование асимметричной компактной структуры *HsTyrRS*, в которой цитокіновий ELR-мотив является экранированным в результате взаимодействия с С-модулем. Проведено компьютерное моделирование молекулярной динамики мутантных форм тирозил-тРНК синтетазы, связанных с нейропатией Шарко-Мари-Туса, и обнаружены локальные конформационные изменения в неструктурированной петле CP1-вставки свертки Россмана, сопровождающиеся формированием метастабільных  $\beta$ -структурных элементов. На основе построенной модели



комплекса *HsTyrRS*, тРНК<sup>Tyr</sup> и фактора элонгации eEF1A2 предложен механизм влияния мутаций Шарко-Мари-Туса на взаимодействие с ее макромолекулами-партнерами. Высказано предположение, что обнаруженные конформационные эффекты могут приводить как к изменению конформации активного центра, так и к изменению специфических взаимодействий мутантных форм с фактором элонгации eEF1A и/или тРНК<sup>Tyr</sup>.

**Ключевые слова:** тирозил-тРНК синтетаза,  $\beta$ -структура, молекулярная динамика, DI-CMTC, CP1 вставка, ELR-мотив, eEF1A, moldyngrid.

## ABSTRACT

**Savytskyi O.V. Computational modeling of molecular dynamics simulations of *H. sapiens* tyrosyl-tRNA synthetase and its mutant forms. – Manuscript.**

Thesis for Philosophy Doctor (PhD) degree in Biology, speciality 03.00.03. – molecular biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv, 2017.

Tyrosyl-tRNA synthetase of *H. sapiens* (*HsTyrRS*) is a key enzyme of protein biosynthesis, which catalyzes the aminoacylation of cognate tRNA<sup>Tyr</sup> and also reveals non-canonical cytokine activities. The full-length *HsTyrRS* does not reveal cytokine activity, but its proteolytic cleavage reveals IL8-like activity of the N-terminal catalytic module and EMAP II-like activity of non-catalytic C-terminal domain. Earlier, it was found that the ELR-motif (E91 - R93) in *HsTyrRS* is responsible for IL8-like cytokine activity, but the 3D structure of the full-length human TyrRS is still unknown.

In this work we constructed the model of the full-length *HsTyrRS* 3D structure and studied its conformational mobility by all-atom molecular dynamics simulations. MD computations were performed using grid services of MolDynGrid virtual laboratory (<http://moldyngrid.org>).

MD simulations of the full length *HsTyrRS* have shown that the binding of C-terminal modules to mini-TyrRS catalytic dimer is highly asymmetric in terms of the interface structure and dynamics. Strong hydrogen bonding between the R93 residue of the ELR cytokine motif and A340 and E479 residues of C-module was observed in MD simulations. These data support the idea that the full length *HsTyrRS* lacks its cytokine activity due to the interaction between N- and C-terminal modules, which protect the ELR cytokine motif.

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is a group of heterogeneous inherited disorders, that is characterized by degeneration of peripheral nerve fibers, loss of muscle tissue and touch sensation. Two heterozygous missense mutations (G41R, E196K) and one *de novo* deletion (153-156delVKQV) in *HsTyrRS* were identified in different families of patients with DI-CMTC. The common mechanism of these mutations is still unknown.

In this work the 3D structures of G41R, E196K and 153-156delVKQV *HsTyrRS* mutants have been modelled. Long 100 ns MD simulations of G41R and

153-156delVKQV mutants of *HsTyrRS* revealed significant changes of their conformational dynamics. In general, mutant proteins revealed less relaxed states with higher values of root-mean square fluctuations. Analysis of spatial contacts between 2 monomers in enzyme revealed the expanded dimer interface in *HsTyrRS*. The melting of H9 helix (T141-A148) and subsequent partial melting of H11 helix were observed in 153-156delVKQV mutant of *TyrRS*. A novel  $\beta$ -sheet formation was observed in K147-E157 region (monomer A) in G41R mutant for 20-100 ns and in K146-E151 region (monomer B) in 153-156delVKQV mutant for 5-65 ns time interval of MD simulation in CP1 region of Rossmann fold.

Our results support the idea, that defects of the intermolecular interfaces in the complexes of mutational forms of *HsTyrRS* with cognate tRNA<sup>Tyr</sup> and/or eEF1A2 may be common molecular mechanism of Charcot-Marie-Tooth disorder.

**Key words:** tyrosyl-tRNA synthetase, Charcot-Marie-Tooth neuropathy, DI-CMTC, grid computing, CP1 insertion, molecular dynamics, computational modeling, moldyngrid.