

На правах рукописи



МАКАРОВ Геннадий Иванович

**МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ РИБОСОМНОГО ТУННЕЛЯ
И ЕГО КОМПЛЕКСОВ С АНТИБИОТИКАМИ**

Специальность 02.00.10 — биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Москва — 2016

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений химического факультета
Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования
«Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова».

- Научный
руководитель:** **Богданов Алексей Алексеевич,**
доктор химических наук, профессор, академик РАН
- Научный
консультант:** **Головин Андрей Викторович,**
доктор химических наук, доцент
- Официальные
оппоненты:** **Тевяшова Анна Николаевна,**
доктор химических наук, старший научный сотрудник,
лаборатория химической трансформации антибиотиков
Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Научно-исследовательский институт по
изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», Москва
- Никулин Алексей Донатович,**
кандидат химических наук, заместитель директора,
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Институт белка Российской академии наук», Пушкино
- Ведущая
организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт биоорганической химии имени академиков
М.М Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва

Защита состоится 27 сентября 2016 г. в 16⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета
Д 501.001.41 по химическим наукам при Московском Государственном Университете имени
М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 40, НИИ ФХБ,
аудитория 501.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени
М.В. Ломоносова, и на сайте химического факультета www.chem.msu.ru

Автореферат разослан « » июля 2016 года.

Учёный секретарь диссертационного
совета, кандидат химических наук, доцент



Смирнова И.Г.

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Рибосома есть молекулярная машина, синтезирующая все клеточные белки по программе, записанной в последовательности нуклеотидных остатков информационной РНК (мРНК). Переходы рибосомы между стадиями этого процесса регулируются скоординированными изменениями структуры самой рибосомы и её лигандов — транспортных РНК (тРНК) и белковых факторов трансляции. Эта взаимная координация должна обеспечиваться передачей неких сигналов между функциональными центрами рибосомы, обычно разнесенными друг от друга на расстояние, достигающее нескольких десятков ангстрем, что позволяет предположить, что перенос этих сигналов происходит аллостерически. Существуют свидетельства о том, что рибосомные РНК (рРНК) играют в этом процессе ключевую роль. Таким образом, познание принципов и механизмов работы рибосомы требует изучения динамических свойств её составляющих, в том числе, на уровне движения отдельных нуклеотидных и аминокислотных остатков.

Однако существующие экспериментальные методы изучения рибосомы не вполне справляются с этой задачей. Биохимические методы, детально описывая функционирование рибосомы, почти ничего не говорят о структурных основаниях наблюдаемых явлений. С другой стороны, наиболее информативные структурные методы исследования рибосомы — рентгеноструктурный анализ и криоэлектронная микроскопия — предоставляют сведения о структуре рибосомы и её комплексов с лигандами в тех или иных «замороженных» состояниях, мало говоря при этом о подвижности мономерных составляющих её рРНК и белков. Возникающее затруднение разрешает метод молекулярной динамики (МД), позволяющий моделировать внутримолекулярную подвижность белков и нуклеиновых кислот в растворе с атомным разрешением. Этот метод многократно применялся к описанию различных динамических аспектов структуры и функционирования рибосомы, увязывая воедино наблюдаемые в процессе работы рибосомы крупномасштабные явления, структурные механизмы этих явлений и определяющие эти механизмы физико-химические процессы и формируя, таким образом, целостное и многоуровневое представление о работе рибосомы.

Интересным объектом для приложения метода МД является рибосомный туннель (РТ), канал, по которому синтезируемая полипептидная цепь выходит в цитоплазму.

Он обеспечивает также образование полипептидной цепью элементов вторичной структуры и регуляцию трансляции. Кроме того, РТ является мишенью многих антибиотиков. Это предполагает, что РТ, как и рибосома в целом, есть динамическая система, реагирующая на проходящую через него пептидную цепь и связывающиеся с его стенками антибиотики. Особый интерес к РТ обусловлен тем, что он большей частью составлен из остатков 23S рРНК, так что именно динамические свойства нуклеотидных остатков должны определять и его динамические свойства. Таким образом, РТ оказывается как бы моделью рибосомы: системой, чье динамическое поведение и реакция на какие-либо воздействия, возможно опосредуемая аллостерической передачей сигналов, осуществляется главным образом за счет рРНК. В силу этого моделирование молекулярной динамики РТ позволяет, наряду с исследованием некоторых специфических сторон его функционирования, отработать приемы молекулярно-динамического моделирования внутририбосомных процессов вообще.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы было молекулярно-динамическое исследование рибосомного туннеля и связывающихся в нем антибиотиков для того, чтобы ответить на ряд ещё не решенных фундаментальных вопросов, стоящих перед современной рибосомологией. Для её осуществления ставились следующие задачи:

1. Подготовить для молекулярно-динамического моделирования структуру 50S субъединицы рибосомы *E. coli*, несущую модифицированные нуклеотидные остатки и молекулярно-механические параметры для этих остатков.
2. Смоделировать движение рибосомного туннеля рибосомы *E. coli* дикого типа и несущей некоторые мутантные нуклеотидные остатки в 23S рРНК, в том числе m^2m^8A2503 , с целью найти подходы для решения проблемы механизмов передачи аллостерических сигналов в рибосоме.
3. Смоделировать комплексы эритромицина, линезолида, клиндамицина и хлорамфеникола с 50S субъединицей рибосомы *E. coli* дикого типа и остаток m^2m^8A2503 для того, чтобы попытаться более глубоко понять причины устойчивости рибосом к антибиотикам.
4. Смоделировать комплексы тилозина и его производных, а также альдегидных производных эритромицина с 50S субъединицей рибосомы *E. coli* с целью поиска

структурных причин их аномальной биологической активности.

Научная новизна

Предлагаемая диссертационная работа, посвященная молекулярно-динамическому исследованию рибосомного туннеля и связывающихся в нем антибиотиков, представляет собой оригинальное научное исследование. При её выполнении впервые были смоделированы комплексы тилозина, 5-О-микаминозилтилонолида и его аминокислотных производных с рибосомой *E. coli*, проанализированы образуемые ими со стенками рибосомного туннеля межмолекулярные взаимодействия и показано, что в их связывании решающую роль играют водородные связи, а образование карбиноламиновой группы при взаимодействии с аденином A2062 также стабилизируется внутримолекулярной водородной связью. Впервые смоделированы комплексы альдегидных производных эритромицина, на которых выявлена важная роль совместной координации ионов магния в связывании низкомолекулярных лигандов с рНК. Впервые описан механизм сложного обратимого конформационного перехода в рНК, аллостерически связывающего пептидилтрансферазный центр и сайт связывания макролидов. Наконец, впервые исследован механизм устойчивости бактериальной рибосомы к антибиотикам хлорамфениколу, линезолиду и клиндамицину, обусловленной 2,8-диметилированием A2503 и показано, что эта модификация не только создает прямое стерическое затруднение при связывании антибиотиков, но и провоцирует перестройку межмолекулярных взаимодействий в рНК, приводящую к небольшим изменениям в структуре сайтов связывания, понижающих их сродство к антибиотикам. При этом предсказана устойчивость к эритромицину рибосом, несущих m²m⁸A2503.

Практическая значимость

Исследование механизма устойчивости бактериальной рибосомы к антибиотикам, вызываемой 2,8-диметилированием аденина в нуклеотидном остатке 23S рНК A2503 позволяет разрабатывать новые антибактериальные препараты, преодолевающие этот механизм защиты бактерий. Обнаруженное явление совместной координации ионов в связывании низкомолекулярных лигандов с нуклеиновыми кислотами имеет большое значение для разработки биологически активных соединений, прямо предписывая учитывать это явление при подборе новых скоринг-функций программ докинга, изучении связывания существующих низкомолекулярных лигандов и разработке новых.

Достоверность полученных результатов доказывается согласием результатов вычислений с экспериментальными данными других исследователей и подтверждается их публикацией в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Апробация работы

Основные результаты работы докладывались на 4 конгрессах и конференциях: XXV Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (РФ, Москва, 2013), 38th Congress of the Federation of European Biochemical Societies FEBS (РФ, Санкт-Петербург, 2013), The First Kazan Summer School in Chemoinformatics (KSSCI-2013) (РФ, Казань, 2013), IX International conference of young scientists on chemistry «MENDELEEV 2015» (РФ, Санкт-Петербург, 2015).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Молекулярно-динамическое моделирование верно описывает динамическое поведение комплексов тилозина и его производных с бактериальной рибосомой. Прочность их связывания, в основном, определяется прочностью образуемых ими со стенками рибосомного туннеля водородных связей. Образование карбиноламинной группы при взаимодействии б-ацетальдегидного фрагмента производных тилозина и экзоциклической аминогруппой нуклеотидного остатка A2062 также стабилизируется внутримолекулярной водородной связью между гидроксильной группой карбиноламина и O3 или O9 макролактонного кольца.
2. Совместная координация иона магния рибонуклеиновой кислотой, уложенной в компактную третичную структуру, и низкомолекулярным лигандом вносит значительный вклад в их взаимодействие и поэтому должна учитываться как при исследовании взаимодействий существующих соединений с такими РНК, так и при разработке новых лигандов к ним.
3. В РНК возможно разворачивание сложных обратимых конформационных переходов, сопровождающихся перестройкой сети стэкинг-взаимодействий и водородных связей, которые могут аллостерически связывать удаленные друг от друга функционально важные области их структур.
4. Адаптивные модификации рРНК могут подавлять связывание антибиотиков не только создавая стерические затруднения или прямо блокируя доноры и

акцепторы водородных связей, но и аллостерически — провоцируя изменения пространственной структуры РНК, понижающие её сродство к антибиотику.

Личный вклад Часть задач поставлена лично автором. Все новые методы и подходы разработаны лично автором, все вычислительные эксперименты выполнены лично автором. Остальные результаты получены в соавторстве. Обсуждение и оформление результатов также выполнены лично автором.

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 3 печатных работах, все из которых изданы в журналах, рекомендованных ВАК, и в 4 тезисах докладов.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, результатов и их обсуждения, материалов и методов, выводов. Полный объём диссертации – **158** страниц текста с **48** рисунками и **6** таблицами. Список литературы содержит **232** наименования.

Содержание работы

Изучение связывания тилозина

В нашей лаборатории проводится исследование рибосомного туннеля, с помощью производных различных антибиотиков, в том числе, представителей семейства 16-членного макролидного антибиотика тилозина. В их ходе потребовалось получить сведения о структуре комплекса тилозина с рибосомой *E. coli* и обо всех взаимодействиях со стенками РТ. Эта задача могла быть решена с использованием метода моделирования молекулярной динамики.

Для выполнения этого моделирования необходимо было ввести в структуру 50S субъединицы рибосомы *E. coli* модифицированные нуклеотидные остатки, часть которых находится в непосредственной близости от сайта связывания макролидов. На тот момент ещё не были доступны атомные структуры рибосом с расставленными модифицированными остатками, поэтому расстановку модификаций пришлось выполнять самостоятельно, основываясь на структуре комплекса эритромицина А с рибосомой *E. coli* (код PDB: 4V7U). Полученная структура 50S субъединицы была оптимизирована методами молекулярной механики, что, естественно, потребовало подготовки молекулярно-механических параметров и топологий модифицированных нуклеотидных остатков, отсутствовавших в используемом силовом поле parm99sb.

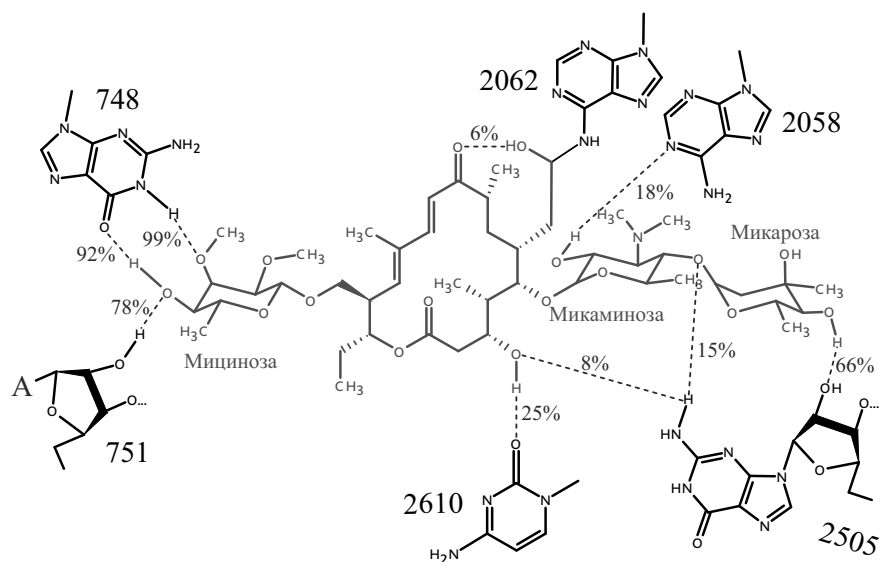


Рис. 1. Наиболее устойчивые водородные связи тилозина (выделен серым). Водородные связи изображены пунктиром, рядом подписана частота встречаемости.

Из полученной структуры был выбран кубический фрагмент, содержащий пептидилтрансферазный центр и рибосомный туннель, который и использовался в дальнейших расчетах. В этот фрагмент была введена структура тилозина, причем макролактонное кольцо было ковалентно связано с экзоциклической аминогруппой аденина A2062, образуя карбиноламиновую группу. Для описанной системы была получена траектория протяженностью в 600 нс.

Анализ полученной траектории показал, что тилозин мало движется в сайте связывания. Высокая устойчивость его положения и малая подвижность его частей объясняются, кроме ковалентной связи с A2062, множеством водородных связей, образуемых в сайте связывания — в каждом кадре траектории тилозин образует, в среднем, четыре водородных связи. Большая их часть создается остатками сахаров (Рис. 1), причем остаток мицинозы образует две чрезвычайно прочных водородных связи с O6 и N1H нуклеотидного остатка G748 и одну чуть менее стойкую связь с 2'-гидроксильной группой остатка A751, что согласуется с порождаемой метилированием основания G748 по 1-амидному азоту или 2-аминогруппе устойчивостью к тилозину. Также наблюдается характерная для макролидов водородная связь между 2'-гидроксильной группой остатка микаминозы и N1 аденина A2058. Водородные связи, образуемые лактонным кольцом, менее стабильны, чем водородные связи, образуемые остатками сахаров, так что последние как бы удерживают лактонное кольцо с двух сторон, способствуя его правильному

расположению.

Конформация лактонного кольца такова, что гидроксильные и карбонильные группы, сольватация которых выгодна, обращены в просвет РТ, а гидрофобные метильные группы — к стенкам РТ, связываясь с «гидрофобной площадкой», образованной плоскостями гетероциклических оснований н.о. А2058 и С2611. Эта «гидрофобная площадка» вместе с аденином А2059 образует так называемый «гидрофобный карман», в который входит 8-метильная группа лактонного кольца тилозина. При этом гетероциклические основания остатков А2058 и А2059, потенциально способные вступать в стэкинг-взаимодействие, раздвигаются, будучи как бы расклиненными участком лактонного кольца. Лактонное кольцо обеспечивает гидрофобный эффект при связывании тилозина.

Высокоизбирательные нековалентные взаимодействия, особенно водородные связи, важны для связывания тилозина, поскольку они выполняют такое его ориентирование в сайте связывания, которое оптимально для образования ковалентной связи и карбиноламина. Это ковалентное связывание, хотя и обратимо, сильнейшим образом закрепляет тилозин в сайте связывания, синергически взаимодействуя с нековалентным связыванием: нековалентные взаимодействия облегчают повторное образование разрушившейся ковалентной связи, а ковалентная связь стабилизирует нековалентные взаимодействия, понижая подвижность молекулы антибиотика. Образование именно карбиноламиновой группы объясняется её стабилизацией внутримолекулярной водородной связью между гидроксильной группой карбиноламина и 9-карбонильным кислородом тилонолида. При этом углубляется соответствующий ей энергетический минимум, что затрудняет распад карбиноламина с образованием основания Шиффа. Кроме того, такая стабилизация карбиноламиногруппы водородной связью сдвигает равновесие между карбиноламином и альдегидом и амином в сторону образования карбиноламина, облегчая ковалентное связывание не только кинетически, но и термодинамически.

Изучение механизма передачи аллостерических сигналов в рибосомном туннеле

Для изучения динамики нуклеотидных остатков, составляющих РТ, нами было предпринято молекулярно-динамическое моделирование центрального фрагмента большой субъединицы рибосомы *E. coli*, включающего весь пептидилтрансферзный

центр (ПТЦ) и РТ. Для этой системы была получена двадцать одна траектория продолжительностью от 200 нс до 360 нс. При их анализе были обнаружены конформационные переходы, в которых наряду с остатками, принадлежащими участку 2058-2063 23S рРНК, были задействованы и некоторые н.о. ПТЦ. Основные конформационные переходы состоят в следующем. Во-первых, основания A2058 и A2059 сближаются. Во-вторых, основание C2063 расходится с основанием G2061, с которым до того образовывало стэкинг-взаимодействие. Благодаря этому основание A2062 может, повернувшись вокруг гликозидной связи, вклиниться между ними, образуя триаду оснований G2061-A2062-C2063, скрепленных стэкинг-взаимодействиями. В-третьих, конформация нуклеотидного остатка U2585, принадлежащего к так называемому «консервативному кольцу» ПТЦ, изменяется так, что его основание образует стэкинг-взаимодействие с основанием н.о. C2063. Иногда эти события происходят поодиночке, иногда — совместно, причем в одной из траекторий они соединяются в единый конформационный переход, начинающийся с того, что на 60 нс основания A2058 и A2059 сходятся, вслед за чем происходят все описанные выше события в том же порядке, в котором они перечислены. В конце связанные стэкинг-взаимодействиями блок оснований A2058-A2059-m²A2503-G2061, существовавший до конформационного перехода, и вновь образовавшийся блок оснований A2062-C2063-U2585 соединяются в единую стопкообразную структуру (Рис. 2).

Наблюдаемые нами изменения конформаций нуклеотидных остатков в сегменте A2058-C2063 и контактирующих с ним нуклеотидных остатков m²A2503 и U2585 обратимы, что было установлено с помощью метода метадинамики. Используя в качестве обобщенных переменных наиболее сильно изменяющиеся в процессе конформационного перехода торсионные углы, мы запустили метадинамику, исходя из состояния, достигаемого моделируемой системой в конце конформационного перехода (Рис. 2,з). Состояния в полученной таким образом траектории кластеризовали, получив 21 состояние, каждое из которых было ближайшим к центру соответствующего кластера. Отобранные состояния стали исходными для расчетов равновесной динамики. Смысл этого действия состоял в том, чтобы полученные состояния системы, находятся вблизи седловой точки на ландшафте свободной энергии и могут преодолеть её только за счет кинетической энергии и случайных флуктуаций скоростей. Действительно, в части траекторий система оказалась в состоянии, близком к тому, из которого развивается конформационный

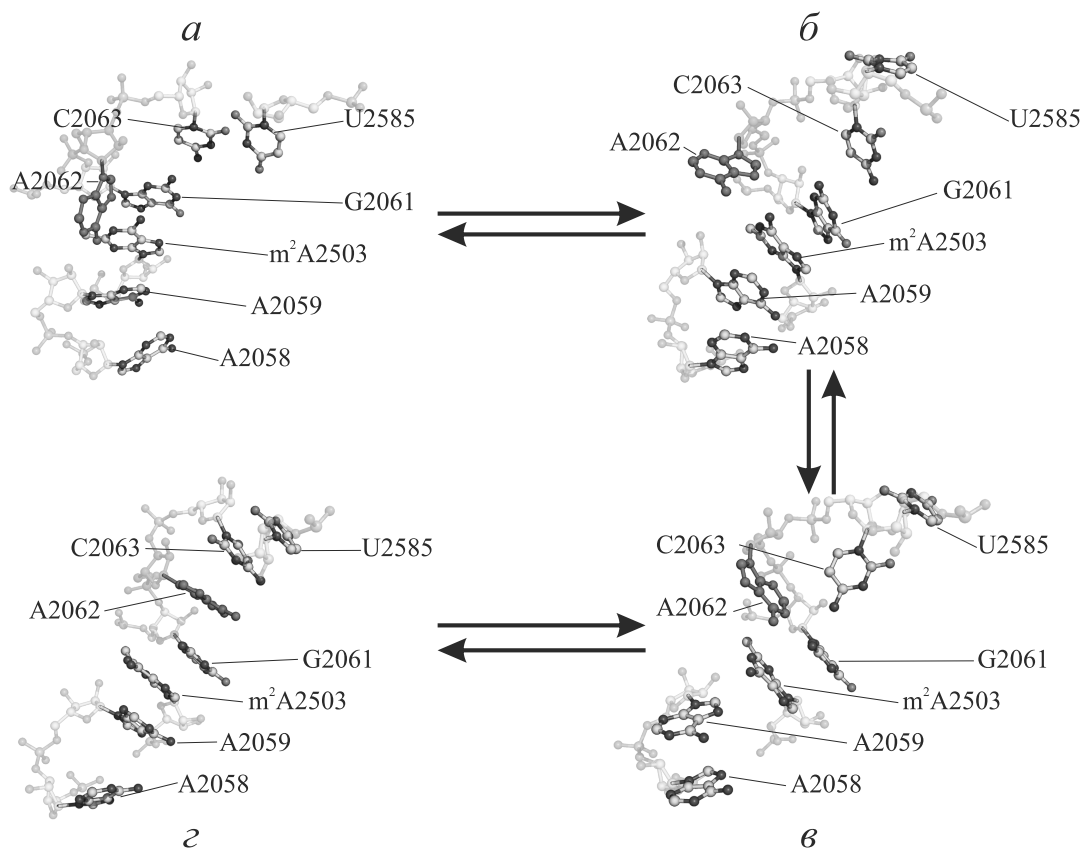


Рис. 2. Основные фазы конформационного перехода в участке A2058-C2063 23S рРНК рибосомы *E. coli*, наблюдаемого посредством моделирования молекулярной динамики: *a* — начальная (4 нс); *б* и *в* — промежуточные (71 и 117 нс соответственно) и *г* — конечная (353 нс) стадии. Нуклеотидный остаток A2062 выделен сплошным красным.

переход (Рис. 2, *a*).

Следует полагать, что движущие силы этого конформационного перехода заключаются в гидрофобном эффекте и стэкинг-взаимодействиях. Ведь при его разворачивании убывает гидрофобная поверхность системы, поскольку основания нуклеотидных остатков A2062 и U2585, в исходной структуре пребывавшие в просвете рибосомного туннеля, вступают в стэкинг-взаимодействия со своими новыми соседями. Действительно, при вхождении основания A2062 между C2063 и G2061 и образовании контакта между C2063 и U2585 изменение энергии нековалентных взаимодействий составляет -19 ± 10 кДж/моль (здесь и далее под энергией нековалентных взаимодействий подразумевается сумма энергий кулоновских и ван-дер-ваальсовых взаимодействий между называемыми группами атомов, вычисленная согласно параметрам силового поля parm99sb; с помощью этой величины удобно сравнивать разные взаимодействия, возникающие в изучаемой системе, но она **не является** свободной энергией Гиббса или Гельмгольца, а

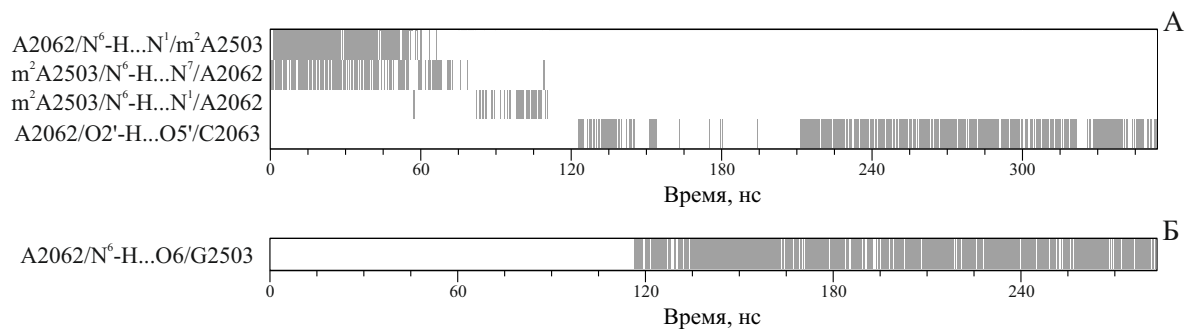


Рис. 3. Схема, показывающая образование основных водородных связей нуклеотида A2062 при моделировании молекулярной динамики. Серая вертикальная черта отражает существование указанной водородной связи в данный момент времени. А: обычная система; Б: карта водородных связей нуклеотида G2503, полученная из траектории с мутацией A2503G *in silico*.

совпадение их размерности обусловлено формализмом молекулярной механики). В ходе конформационных перестроек между 80 и 160 нс система преодолевает энергетический барьер, отвечающий конформациям, в которых основания G2061 и C2063 уже разошлись, но A2062 и U2585 ещё не образовали с ними контакты, стабилизированные стэкинг-взаимодействиями.

Известно, что мутации по положению 2062 23S рРНК подавляют остановку трансляции стоп-пептидами, мало влияя на работу ПТЦ. На основании этого появилось предположение о том, что остаток A2062 участвует в передаче аллостерического сигнала в ПТЦ из удаленных от него областей РТ, а мутации A2062 её обрывают. Аналогичные данные были получены теми же исследователями для н.о. m²A2503. Опираясь на эти сведения, мы смоделировали две системы, в одной из которых заменили аденин остатка A2062 на урацил, а в другой заменили 2-метиладенин остатка m²A2503 на гуанин. Введение таких мутаций *in silico* подавило разворачивание описанного выше конформационного перехода. В системе с заменой A2062U основание U2062 ненадолго вклинивалось между G2061 и C2063 и легко уходило обратно, будучи неспособным образовать с соседями устойчивый ассоциат из-за более слабых стэкинг-взаимодействий. Для системы же с заменой m²A2503G наблюдалось образование прочной не-уотсон-криковской G-A-пары между основаниями G2503 и A2062 (Рис. 3,Б), что препятствовало дальнейшему разворачиванию конформационного перехода.

Как может закрепляться необычная конформация сегмента A2058-C2063, возникающая в результате его согласованных изменений? Конформационный переход возбуждается сближением гетероциклических оснований в диаде A2058-A2059.

Возможно предположить, что при продвижении по РТ вновь синтезируемого пептида некий его гидрофобный остаток X входит между этими аденинами, раздвигая их. В отличие от макролидов, это взаимодействие с «гидрофобным карманом» будет легко обратимо, так что до совершения следующего шага наращивания пептидной цепи остаток X может многократно покинуть образованную остатками A2058 и A2059 гидрофобную область и войти в неё вновь, возбуждая описанные выше конформационные изменения. Последующие события будут различаться в зависимости от аминокислотной последовательности С-концевого участка растущего пептида. Недавно было найдено, что всего лишь трехчленные пептиды со специфической аминокислотной последовательностью, находящиеся на 3'-конце связанной в ПТЦ тРНК, могут останавливать трансляцию. Эта остановка обусловлена их взаимодействиями с нуклеотидными остатками РТ, находящимися в непосредственной близости от ПТЦ. Тогда, если аминокислотная последовательность С-концевого участка растущего пептида такова, что он может связаться с триадой G2061-A2062-C2063, имеющей стопкообразный вид, то трансляция будет замедлена или вовсе остановится из-за появления устойчивого контакта U2585 с C2063. Если же С-концевой участок растущего пептида не будет обладать этим свойством, то значимого замедления трансляции не произойдет. Таким образом может происходить регуляция трансляции любыми эффекторами, могущими обратимо связываться с сенсорной диадой A2058-A2059.

Изучение механизма устойчивости к антибиотикам, вызываемой 2,8-диметилированием A2503

Исходя из предположения, что механизм устойчивости болезнетворных микроорганизмов к применяемым против них антибиотиками связан с динамическими свойствами рибосомы, мы предприняли молекулярно-динамическое моделирование изучаемого нами района РТ, содержащего 2,8-диметилированный остаток A2503. Такая модификация 23S рРНК осуществляется метилтрансферазой Cfr. В рибосомах бактерий дикого типа остаток A2503 подвержен конститутивному 2-метилированию метилтрансферазой RlmN. Совместное действие метилтрансфераз RlmN и Cfr приводит к превращению A2503 в m²m⁸A2503 и появлению устойчивости бактерий к антибиотикам разных групп, связывающихся с ПТЦ рибосомы и примыкающей к нему верхней части РТ, а именно, фениколам, линкозамидам,

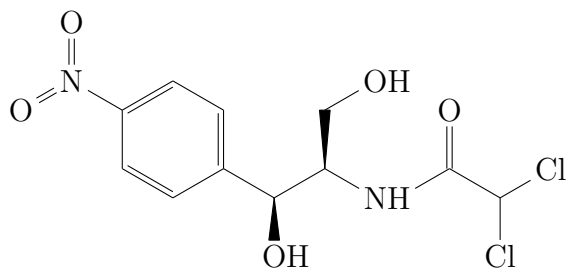


Рис. 4. Хлорамфеникол.

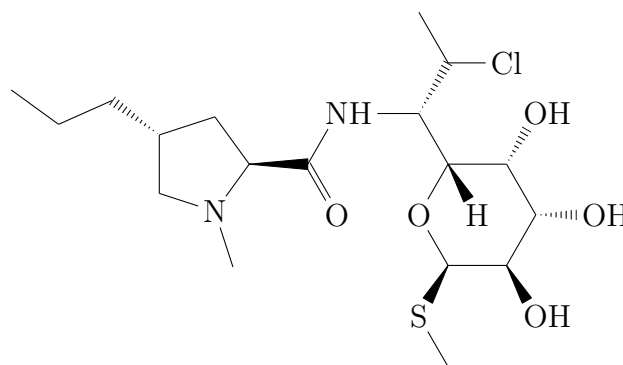


Рис. 5. Клиндамицин.

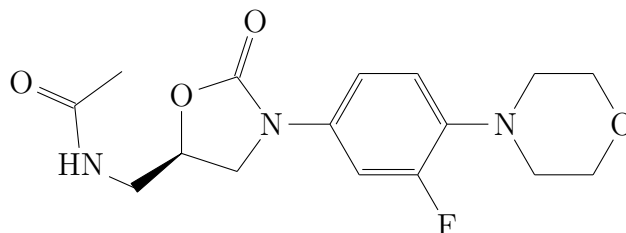


Рис. 6. Линезолид.

оксазолидинонам, плевромутилинам и некоторым макролидам. Необходимо отметить, что пространственная структура рибосомы с диметилированным остатком A2053 неизвестна, а детальный структурный анализ комплексов модифицированной таким образом рибосомы с антибиотиками не проводился.

В настоящей работе мы промоделировали комплексы клиндамицина (Рис. 5), линезолида (Рис. 6), хлорамфеникола (Рис. 4) и эритромицина с большой субъединицей рибосомы *E. coli*, содержащей как m^2A2503 , так и остаток m^2m^8A2503 вместо m^2A2503 . Молекулярно-динамическое моделирование отобразило экспериментально наблюдаемую устойчивость рибосомы к клиндамицину, линезолиду и хлорамфениколу, вызываемую 2,8-диметилированием A2503, что выражалось в ослаблении водородных связей и увеличении подвижности антибиотика в рибосоме, несущей m^2m^8A2503 . В литературе *a priori* предполагается, что 8-метильная группа остатка аденина в m^2m^8A2503 создает пространственное затруднение для антибиотика и этим предотвращает его связывание. Действительно, пространственным затруднением можно было бы объяснить поведение антибиотиков, сайты связывания которых находятся рядом с m^2A2503 , например, клиндамицина. Однако для хлорамфеникола, по данным рентгеноструктурного анализа не контактирующего непосредственно с н.о. A2503, также наблюдается устойчивость. Поэтому можно было предположить, существование некоего общего для смоделированных антибиотиков способа ингибирования их связывания с рибосомой, основанного не на простом

пространственном затруднении, вызываемом дополнительной метильной группой в m^2m^8A2503 , но связанного с изменениями в динамическом поведении н.о. РТ, вызываемого такой модификацией.

Для проверки этого предположений были рассчитаны 14 траекторий системы с введенным m^2m^8A2503 , протяженностью от 160 нс до 400 нс. В ходе анализа они сравнивались с траекториями системы «дикого типа», несущей остаток m^2A2503 , полученными ранее. Подвижность нуклеотидных остатков вблизи сайтов связывания антибиотиков одновременно падает или растет для системы с m^2m^8A2503 относительно системы с m^2A2503 . Эти изменения согласуются с изменениями в подвижности остатков, наблюдавшихся для систем с антибиотиками. Они не связаны с ослаблением стэкинг-взаимодействий гетероциклического основания $A2503$ с основаниями соседних остатков $A2059$ и $G2061$, поскольку, если триада $A2059-A2503-G2061$ образует устойчивый стэкинг, то энергии взаимодействий для пар $A2059-A2503$ и $A2503-G2061$ в случае $C^{2,8}$ -диметилирования $A2503$ выше на 5 кДж/моль, чем соответствующие энергии в случае 2-монометилирования $A2503$.

Однако 8-метильная группа в m^2m^8A2503 , усиливая его взаимодействия с соседними основаниями, может влиять на конфигурацию стопки оснований, в которую входит этот н.о. Для проверки этой идеи была проведена оценка изменения ориентации плоскостей оснований в пространстве в траектории с помощью специально написанной программы. Оказалось, что при диметилировании $A2503$ гетероциклические основания $A2059$, $A2503$ и $G2061$ тяготеют к повороту относительно условной оси РТ. Анализ стэкинг-взаимодействий показывает, что в стопке оснований $G2056-G2061$ при 2,8-диметилировании $A2503$ усиливаются взаимодействия между основаниями $G2057$, $A2058$, $A2059$ и $A2503$, но ослабевает взаимодействие между основаниями $A2503$ и $G2061$. Результаты анализа стэкинг-взаимодействий подтверждаются расчетом энергий. Пик в распределении энергии взаимодействия оснований $A2059-A2503$, отвечающий наивысшим энергиям (то есть стэкингу), смещается в сторону более отрицательных значений для системы с 2,8-диметилированием $A2503$. При этом увеличиваются такие же пики для всех пар оснований в стопке $G2057-A2503$, а пики при меньших энергиях взаимодействия сокращаются. Но при этом для оснований $G2061$ и $A2503$ в системах с m^2m^8A2503 увеличиваются пики, отвечающие гидрофобному контакту (~ -15 кДж/моль) и отсутствию взаимодействия (0 кДж/моль), хотя пик, отвечающий стэкингу, так же смещается в сторону более отрицательных значений. В целом, стабилизация стэкинга в стопке $G2056-A2503$ при

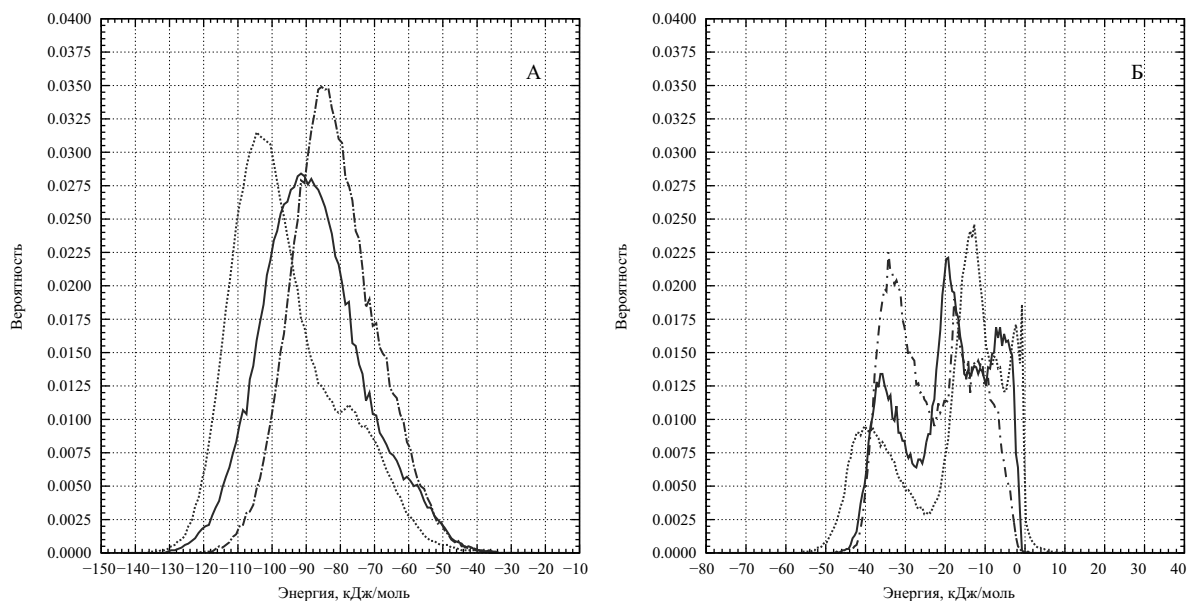


Рис. 7. Распределения суммарной энергии взаимодействий оснований G2056–A2503 (А) и энергии взаимодействия оснований A2503–G2061 (Б). Сплошной линией показаны распределения для систем с m^2 A2503, пунктирной — с m^2m^8 A2503, штрих-пунктирной — с немодифицированным A2503.

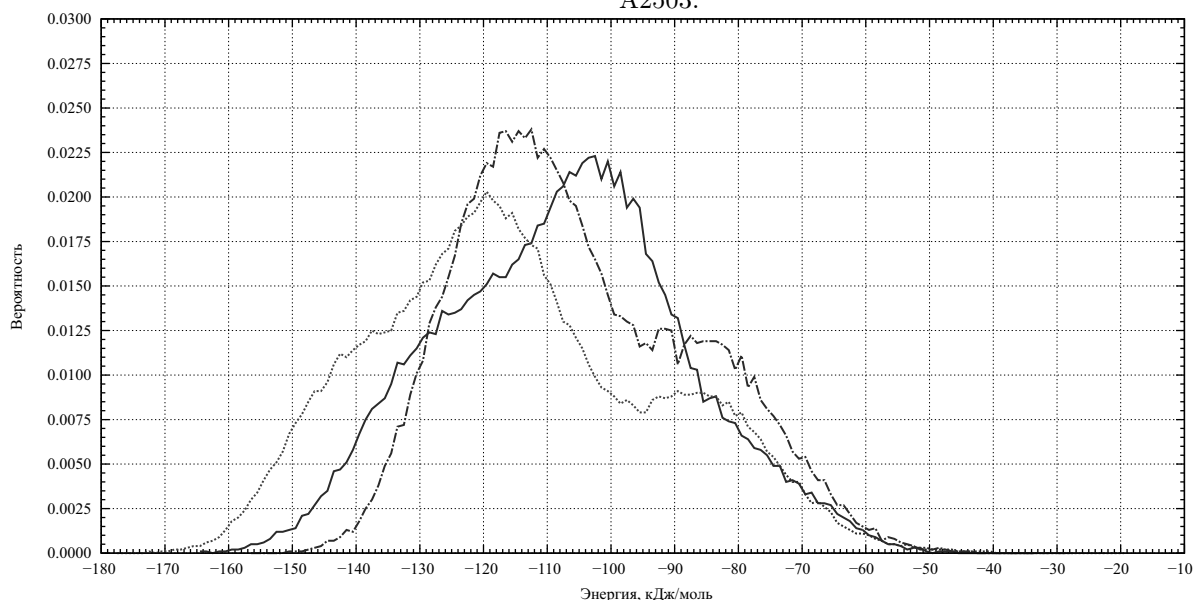


Рис. 8. Распределение суммарной энергии взаимодействий оснований G2056–G2061. Сплошной линией показаны распределения для систем с m^2 A2503, пунктирной — с m^2m^8 A2503, штрих-пунктирной — с немодифицированным A2503.

2,8-диметилированию A2503 происходит за счет упрочения взаимодействия между A2059 и A2503, при котором, однако, для пары A2503–G2061 более энергетически выгодное стэкинг-взаимодействие замещается менее выгодным гидрофобным (Рис. 7). Но это явление энергетически выгодно, поскольку суммарная энергия взаимодействий в стопке G2056–G2061 увеличивается на ~ 17 кДж/моль (с -103 до -120 кДж/моль) (Рис. 8).

Итак, анализ взаимодействий между азотистыми основаниями показывает, что

стэкинг в стопке G2056–A2503 усиливается при ослаблении стэкинга A2503–G2061 и его замещении гидрофобными взаимодействиями. Разумно предположить, что введение 8-метильной группы в 2-метиладенин A2503 приводит к усилению его взаимодействий с A2059, при котором, из-за перераспределения в основании A2503 электронной плотности, наиболее выгодное взаиморасположение оснований A2059 и A2503 требует их отклонения от обычного положения. При этом отклонении основания A2058 и A2059, образующие т.н. «гидрофобный карман» в сайте связывания макролидов, схлопываются с образованием полноценного стэкинга, что приводит к образованию сплошной и стабильной стопки G2056–A2503, каждый из членов которой связан стэкинг-взаимодействием со своими соседями с обеих сторон. Однако при этом поворот A2503 делает менее выгодным образование им стэкинг-взаимодействия с G2061; впрочем, его потеря частично компенсируется уходом 8-метильной группы m^2m^8A2503 из водного окружения к гидрофобной плоскости основания G2061. Выигрыш энергии в стопке G2056– m^2m^8A2503 компенсирует потери во взаимодействии m^2m^8A2503 и G2061, так что в целом описанное положение остатков в системе с 2,8-диметилированием A2503 выгоднее положения, обычного для системы с 2-метилированием A2503 приблизительно на 17 кДж/моль.

Уже этих изменений достаточно, чтобы затруднить связывание линкозамидов и оксазолидинонов, поскольку представители этих классов антибиотиков в комплексах РТ непосредственно контактируют с A2058, A2059, A2503 и G2061 при связывании. Но возмущение структуры рибосомы, создаваемое m^2m^8A2503 , имеет и более общие и далекодействующие последствия. Можно ожидать, что сеть водородных связей в рРНК обладает кооперативностью, так что каждая из образующих её водородных связей в составе сети стабильнее, чем сама по себе, но при этом нарушение одной из связей будет ослаблять все остальные. Следовательно, если нечто нарушит некоторые стабильные водородные связи, поддерживающие структуру сайта связывания макролидов, то это воздействие ослабит и остальные водородные связи, удерживающие пространственную структуру, приводя к изменению распределения конформаций остатков и на неком удалении от области исходного возмущения. И действительно, если взять водородные связи, наиболее стабильные в траекториях с m^2A2503 , то при 2,8-диметилировании A2503 они ослабевают. Поэтому можно утверждать, что изменение положения оснований A2059, A2503 и G2061 будет приводить к изменению конформаций остатков рРНК в РТ и, следовательно, к понижению сродства РТ к антибиотикам, в том числе, и тем, которые не контактируют

прямо с А2503 и его ближайшим окружением.

Изучение связывания альдегидных производных эритромицина

В поиске эффективных ингибиторов трансляции в нашей лаборатории были синтезированы 3'-N-(2-оксоэтил)-3'-N-дезметил-эритромицин А (**I**) и 3'-N-(1-метил-3-оксопропил)-3'-N-дезметилэритромицин А (**II**). Для обоих соединений были определены константы диссоциации их комплексов с рибосомами *E. coli* и определена способность подавлять трансляцию *in vitro*. Константа диссоциации для обоих альдегидных производных оказалась выше, чем для эритромицина, но при этом соединение **II** связывается с рибосомой много прочнее, чем соединение **I**. Для объяснения этого явления предприняли молекулярно-динамическое моделирование структур комплексов этих соединений с рибосомой *E. coli*. Для комплексов **I** и **II** были получены траектории протяженностью 300 и 336 нс соответственно, для комплекса эритромицина были получены две траектории протяженностью 210 нс и 545 нс.

Анализ водородных связей показывает, что у **I** и **II** понижается стабильность характерной для макролидов водородной связи между 2'-ОН остатка аминсахара и N¹ А2058, причем у **II** больше, чем у **I**, и ослабляется устойчивость водородной связи между Lys-90 белка L22 и лактонным кольцом. Эта просадка восполняется у соединения **I** образованием C⁶-NH₂ А2058 водородной связи с 2'-гидроксильным кислородом остатка аминсахара и появлением водородной связи между карбонильным кислородом 2-оксоэтильного фрагмента и C⁶-NH₂ А2059. У соединения **II** 2'-ОН аминсахара образует стойкую водородную связь с остатком G2057, а 4''-ОН остатка кладинозы — устойчивую водородную связь с остатком C2610.

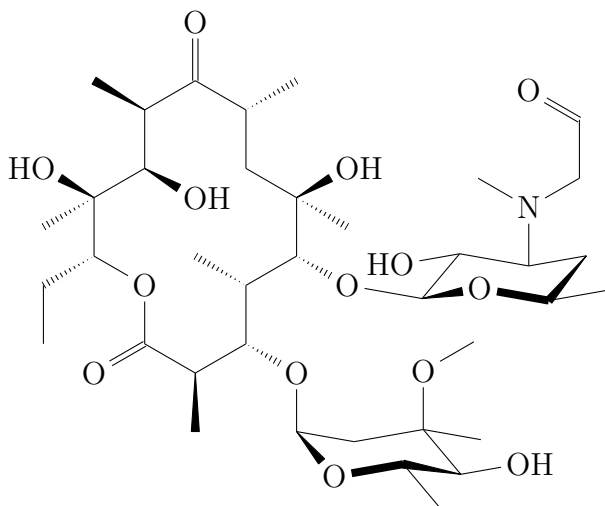


Рис. 9. Производное I.

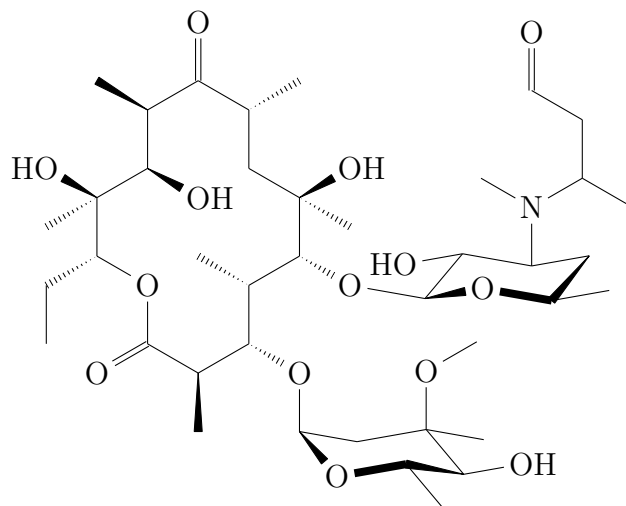


Рис. 10. Производное II.

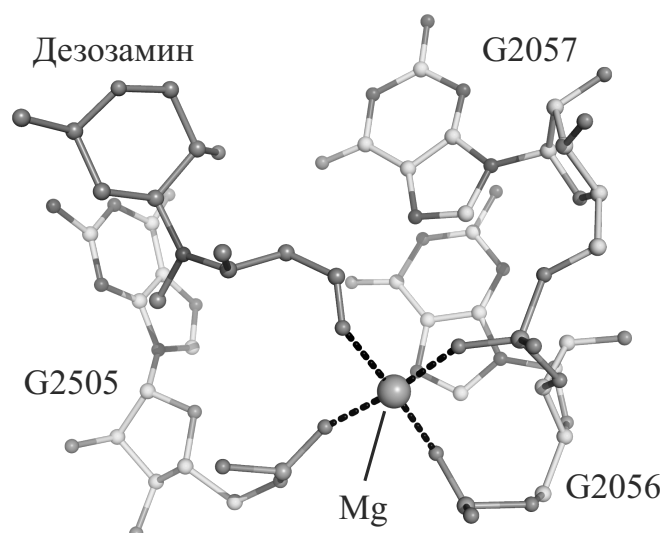


Рис. 11. Совместная координация иона магния карбонильной группой 1-метил-3-оксопропильного фрагмента соединения **II** и фосфатными группами нуклеотидных остатков G2056, G2057 и G2505. Показан только остаток 3'-N-(1-метил-3-оксопропил)-3'-N-дезметилдезозамина.

Таким образом, количество и стабильность водородных связей говорят в пользу большей стабильности комплекса соединения **I** с рибосомой, чем соединения **II**.

Расчет энергий нековалентных взаимодействий показывает, что энергия взаимодействия соединения **II** с рибосомой (~ -280 кДж/моль) уступает таковой для соединения **I** (~ -350 кДж/моль). Это также предполагает более сильное связывание соединения **I**, чем соединения **II**, что противоречит экспериментальным данным. Однако визуальный анализ и расчеты энергий нековалентных взаимодействий показывают, что карбонильная группа 1-метил-3-оксопропильного фрагмента соединения **II** координирует ион магния совместно с фосфатными группами остатков G2056, G2057 и G2505 (Рис. 11). Энергия взаимодействия иона магния с фосфатной группой составляет ~ -350 кДж/моль, а с карбонильной — ~ -170 кДж/моль; координация этого иона указанными группами чрезвычайно устойчива и существует на протяжении всей траектории. Суммарная же энергия взаимодействия соединения **II** с рибосомой и координируемым нуклеотидными остатками её 23S рРНК ионом магния составляет ~ -450 кДж/моль, превосходя энергию взаимодействия соединения **I** с рибосомой. Таким образом, у соединения **II** имеется прочное взаимодействие, делающее удерживание его в сайте связывания сильнее, чем таковое соединения **I**. Совместная с рибосомой координация иона магния соединением **II** становится возможна благодаря более длинной, чем у соединения **I**, цепи альдегидного заместителя в дезозамине: 2-оксоэтильный фрагмент просто не может дотянуться до

сайта координации магния.

Изучение связывания аминокислотных производных ОМТ

Одним из этапов исследований производных макролидов был синтез производных тилозина, являющихся 5-О-микаминозилтилонолидом (ОМТ), этерифицированных N-*трет*-бутилоксикарбониламинокислотами по 23 положению, сопровождавшийся измерением подавления трансляции *in vitro*. При этом активность ВосGlyОМТ превосходит ОМТ, а Вос β AlaОМТ и Вос γ AbuОМТ уступают ОМТ, что неожиданно: ОМТ должен уступать по активности тилозину, поскольку, в отличие от него, не содержит углеводного остатка по 23 положению тилонолида, а Вос-глициновый остаток ВосGlyОМТ мог бы выполнять роль, подобную роли остатка мицинозы в тилозине. Однако почему Вос β AlaОМТ и Вос γ AbuОМТ менее активны, чем ОМТ?

Чтобы объяснить эти факты, было предпринято молекулярно-динамическое моделирование предполагаемых структур их комплексов с рибосомой *E. coli*, подобное тому, которое проводилось для тилозина. При этом были получены траектории протяженностью 500 нс для ОМТ, 700 нс для ВосGlyОМТ, 300 нс для Вос β AlaОМТ и 600 нс для Вос γ AbuОМТ.

Активность исследуемых соединений по подавлению трансляции согласуется со средним числом водородных связей, образуемых соединением в кадре траектории. Однако согласование нарушается для Вос β AlaОМТ, образующего больше водородных связей, чем ВосGlyОМТ, будучи при этом менее активным, чем ОМТ. Объяснение этого требует анализа водородных связей, образуемых этими соединениями со стенками рибосомного туннеля (Рис. 12), поскольку именно эти взаимодействия отвечают за оптимальное для ковалентного связывания ориентирование макролида.

Понижение ингибирующей активности ОМТ относительно тилозина объясняется существенным обеднением образуемых им водородных связей, обусловленным удалением остатков микарозы и мицинозы. ОМТ образует стабильнейшую водородную связь между 2'-ОН микаминозы и N¹ A2058 и водородную связь между фосфатным кислородом m⁵U и освободившейся 23-ОН тилонолида. Как и у тилозина, у ОМТ карбиноламиновая группа образует внутримолекулярную водородную связь с O9 и O3 тилонолида.

Активность ВосGlyОМТ, превосходящая активность остальных исследуемых соединений, объясняется прочными водородными связями, им образуемыми:

чрезвычайно прочным взаимодействием между 2'-ОН микаминозы и N¹ A2058 и связями между карбонильным кислородом остатка глицина и 6-NH₂ A752 и ζ-аминогруппой остатка Lys-90 белка L22. ВосGlyOMT отличается от остальных производных тем, что внутримолекулярная водородная связь образуется карбиноламинной группой не с O9, а только с O3 тилонолида. Также остаток микаминозы ВосGlyOMT взаимодействует с рибосомным туннелем сильнее, чем у других производных — ~ -160 кДж/моль против ~ -130 кДж/моль у OMT.

Подобно ВосGlyOMT, карбонильный кислород остатка γ-аминомасляной кислоты ВосγAbuOMT образует устойчивую водородную связь с C⁶-NH₂ A752. Однако при этом водородная связь между 2'-ОН микаминозы и N¹ остатка A2058 теряет в устойчивости относительно OMT и ВосGlyOMT приблизительно вчетверо, что не может не отозваться в понижении вероятности образования ковалентной связи тилонолида с A2062 и, следовательно, в падении прочности комплекса ВосγAbuOMT с рибосомой. Причиной же такого ослабления взаимодействия остатка микаминозы с рибосомой нужно полагать взаимодействие *трет*-бутилоксикарбонильной группы с гидрофобной плоскостью гуанина G748, выражающееся в большей энергии её нековалентных взаимодействий с рибосомой — ~ -60 кДж/моль у ВосγAbuOMT против ~ -20 кДж/моль у ВосGlyOMT. В целом, из-за смещения тилонолида и микаминозы из сайта связывания макролидов ВосγAbuOMT существенно менее активен, чем OMT и ВосGlyOMT.

Анализ водородных связей, образуемых ВосβAlaOMT, показывает, что это соединение образует устойчивые водородные связи, отличающиеся, однако, от водородных связей, образуемых другими исследуемыми производными: 2'-ОН микаминозы образует водородную связь с N¹ остатка A2059, а не A2058, а O² цитозина C2610 образует водородную связь с 3-ОН тилонолида, не встречающуюся у OMT, ВосGlyOMT и ВосγAbuOMT. Карбонильный кислород остатка β-аланина взаимодействует с ζ-аминогруппой остатка Lys-90 белка L22, как и в случае ВосGlyOMT. Изменение характера водородных связей ВосβAlaOMT относительно других исследуемых соединений свидетельствует о склонности ВосβAlaOMT разворачиваться в сайте связывания макролидов, что необходимо должно затруднять образование ковалентной связи между тилонолидом и аденином A2062, подобно тому, как это происходит с ВосγAbuOMT. *трет*-бутилоксикарбонильная группа и N-конец β-аланина не образуют устойчивых взаимодействий со стенками рибосомного туннеля, беспорядочно двигаясь; таким образом, в этом отношении ВосβAlaOMT

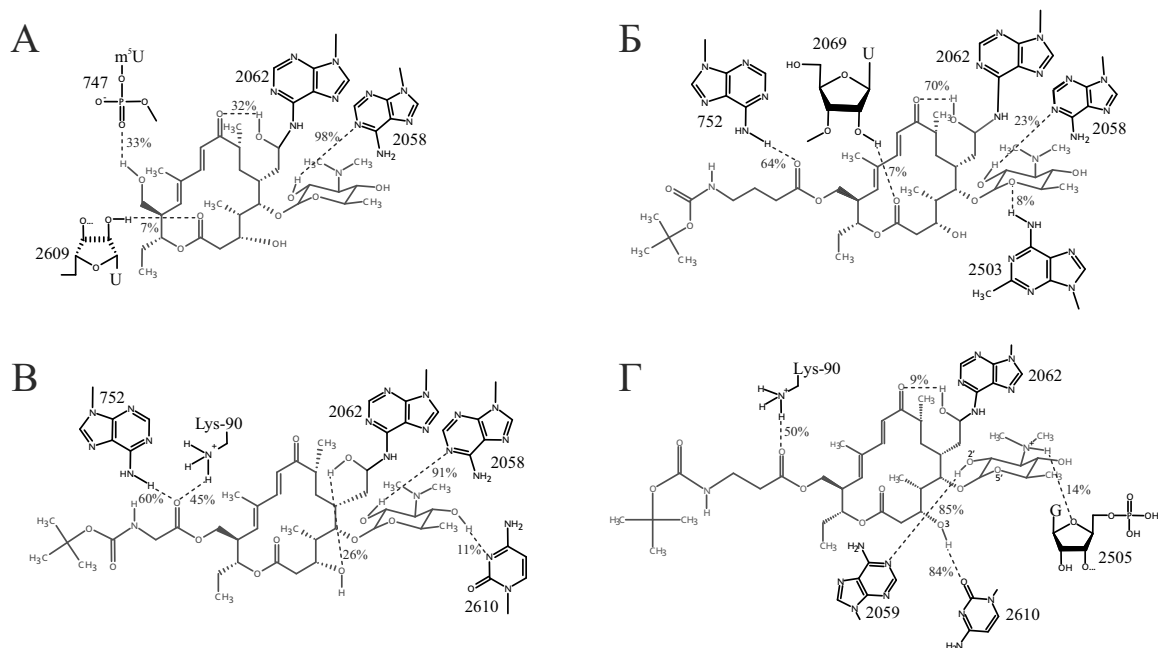


Рис. 12. Наиболее устойчивые водородные связи 5-О-микаминозилтилонолида и его аминокислотных производных (выделены красным). Водородные связи изображены пунктиром, рядом подписана частота встречаемости. А: OMT. Б: Вос γ AbuOMT. В: ВосGlyOMT. Г: Вос β AlaOMT.

уподобляется OMT, при этом проигрывая ему в вероятности образования ковалентной связи с остатком A2062. С другой стороны, Вос β AlaOMT образует более устойчивые водородные связи, чем Вос γ AbuOMT, и меньше смещается из сайта связывания макролидов. Итак, Вос β AlaOMT должен не превосходить OMT по активности, превосходя Вос γ AbuOMT, что и наблюдается в эксперименте по подавлению трансляции *in vitro*.

Выводы

1. Молекулярно-динамическое моделирование верно описывает динамическое поведение комплексов тилозина и его производных с бактериальной рибосомой; оно позволяет объяснить образование карбиноламинной группы при взаимодействии 6-ацетальдегидного фрагмента производных тилозина и экзоциклической аминогруппой нуклеотидного остатка A2062.
2. Совместная координация иона магния рибонуклеиновой кислотой и низкомолекулярным лигандом вносит значительный вклад в их взаимодействие и должна учитываться при разработке новых лигандов к ним.
3. В рибонуклеиновых кислотах возможно разворачивание сложных обратимых конформационных переходов, сопровождающихся перестройкой сети стэкинг-взаимодействий и водородных связей и могущих аллостерически связывать удаленные друг от друга области их структур.
4. Адаптивные химические модификации рибосомных рибонуклеиновых кислот могут подавлять связывание антибиотиков не только через непосредственное создание стерических затруднений или уничтожение водородных связей, но и аллостерически — провоцируя изменения пространственной структуры рибонуклеиновой кислоты, понижающие её сродство к антибиотику.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в научных журналах

1. *Shishkina A., Makarov G., Tereshchenkov A., Korshunova G., Sumbatyan N., Golovin A., Svetlov M., Bogdanov A.* Conjugates of amino acids and peptides with 5-O-mycaminosyltylonolide and their interaction with the ribosomal exit tunnel // *Bioconjugate Chemistry*. — 2013. — Т. 24. — С. 1861—1869.
2. *Макаров Г. И., Головин А. В., Сумбатян Н. В., Богданов А. А.* Изучение механизма передачи аллостерических сигналов в рибосоме методом молекулярной динамики // *Биохимия*. — 2015. — Т. 80, № 8. — С. 1250—1261.
3. *Шлижина А. В., Макарова Т. М., Терещенков А. Г., Макаров Г. И., Коршунова Г. А., Богданов А. А.* Моделирование взаимодействий производных эритромицина с рибосомой // *Биохимия*. — 2016. — Т. 81, № 1. — С. 106—114.

Публикации в сборниках и материалах конференций

1. *Makarov G., Golovin A., Bogdanov A., Shishkina A., Korshunova G., Sumbatyan N.* Molecular dynamics study tylosin and its derivatives binding to *E. coli* ribosome // FEBS Journal. Т. 280. — St.Petersburg, Russia, 2013. — С. 354–354. — (Issue Supplement s1).
2. *Makarov G., Golovin A., Shishkina A., Korshunova G., Sumbatyan N.* Study of tylosin and its derivatives binding to *E. coli* ribosome by molecular dynamics simulation method // The First Kazan Summer School in Chemoinformatics (KSSCI-2013), Alexander Butlerov Institute of Chemistry of Kazan Federal University. — ООО „Инновационно-издательский дом „Бутлеровское наследие““Казань, 2013. — С. 20–20.
3. *Макаров Г. И.* Молекулярно-динамическое исследование связывания тилозина и его производных с рибосомой *E. coli* // XXV Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 11-15 февраля 2013. Т. 2. — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук Москва, 2013. — С. 32–32.
4. *Makarov G.* Molecular dynamics study of allosteric signal transmission in ribosomal tunnel // IX INTERNATIONAL CONFERENCE OF YOUNG SCIENTISTS ON CHEMISTRY «MENDELEEV 2015» Book of abstracts. — Санкт Петербург, 2015. — С. 260–260.

Для заметок