


Государственное образовательное учреждение высшего образования
Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова

Химический Факультет

На правах рукописи



МАКАРОВ Геннадий Иванович

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

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Специальность 02.00.10 — биоорганическая химия

Научный руководитель:
доктор химических наук,
профессор, академик РАН

Богданов А.А.

Научный консультант:
доктор химических наук, доцент

Головин А.В.

Москва – 2016

Оглавление

1	Введение	2
2	Обзор литературы	5
2.1	Строение рибосомы и рибосомного туннеля. Функционирование рибосомы.	5
2.1.1	Строение бактериальной рибосомы	5
2.1.2	Функционирование рибосомы.	11
2.1.3	Рибосомный туннель	22
2.1.4	Заключение	29
2.2	Метод молекулярной динамики	32
2.2.1	Основы метода	32
2.2.2	Избранные методы молекулярной динамики	41
2.2.2.1	Молекулярная динамика с обменом реплик	44
2.2.2.2	Метод зонтичной выборки	46
2.2.2.3	Метадинамика	50
2.2.2.4	Управляемая динамика	53
2.3	Исследование рибосомы методом молекулярной динамики	54
2.3.1	Моделирование рибосомы как молекулярной машины	55
2.3.1.1	Моделирование распознавания тРНК	55
2.3.1.2	Моделирование пептидилтрансферазного центра	58
2.3.1.3	Моделирование транслокации	59
2.3.1.4	Построение крупнозернистых моделей рибосомы	63
2.3.2	Физико-химическое изучение рибосомного туннеля	65
2.3.3	Моделирование рибосомных антибиотиков	67
2.3.4	Заключение	72
3	Результаты и их обсуждение	74
3.1	Изучение связывания тилозина	74

3.2	Изучение механизма передачи аллостерических сигналов в рибосомном туннеле	81
3.3	Изучение механизма устойчивости к антибиотикам, вызываемой C ^{2,8} -диметилированием A2503	93
3.3.1	Клиндамицин	96
3.3.2	Линезолид	97
3.3.3	Хлорамфеникол	99
3.3.4	Системы, не содержащие антибиотиков	101
3.3.5	Эритромицин	111
3.3.6	Заключение	112
3.4	Изучение связывания альдегидных производных эритромицина	114
3.5	Изучение связывания аминокислотных производных ОМТ	121
4	Методы	128
4.1	Моделируемая система	128
4.2	Условия моделирования	130
4.3	Методы анализа траекторий	132
5	Выводы	135

Список сокращений

В работе использованы трехбуквенные обозначения аминокислотных остатков в соответствии с номенклатурой Международного союза чистой и прикладной химии (IUPAC) и Международного союза биохимиков (IUB), а также следующие сокращения:

ПТЦ — пептидилтрансферазный центр

РТ — рибосомный туннель

Woc — *трет*-бутилоксикарбонил

OMT — 5-О-микаминозилтилонолид

WocGlyOMT — 23-(*трет*-бутилоксикарбонил-глицил)-OMT

Woc β AlaOMT — 23-(*трет*-бутилоксикарбонил- β -аланил)-OMT

Woc γ AbuOMT — 23-(*трет*-бутилоксикарбонил- γ -аминобутирил)-OMT

РСА — рентгеноструктурный анализ

RMSF — Root Mean Square Fluctuation, среднее квадратичное смещение данного атома в течение траектории. Служит оценкой подвижности атома.

MSD — Mean Square Displacement, среднее квадратичное смещение данной группы атомов. Служит оценкой смещения данной группы атомов от её исходного положения.

Глава 1

Введение

Рибосома есть молекулярная машина, синтезирующая все клеточные белки по программе, записанной в последовательности нуклеотидных остатков информационной РНК (мРНК). Переходы рибосомы между состояниями в этом процессе регулируются скоординированными изменениями структуры самой рибосомы и её лигандов — транспортных РНК и белковых факторов трансляции [1—5]. Эта взаимная координация неминуемо должна обеспечиваться передачей неких сигналов между функциональными центрами рибосомы [6], обычно разнесенными друг от друга на большое расстояние, достигающее нескольких десятков ангстрем. Эта взаимная удаленность вызывает предположение об аллостерической передаче управляющих сигналов [7], причем существуют существенные свидетельства того, что рибосомные РНК играют в ней ключевую роль [8; 9]. Отсюда следует, что познание принципов и механизмов работы рибосомы требует изучения динамических свойств и динамического поведения составляющих её биополимеров, в том числе, на уровне движения отдельных нуклеотидных и аминокислотных остатков.

Однако доступные современному исследователю экспериментальные методы изучения рибосомы не вполне справляются с этой задачей. Биохимические методы позволяют добыть сведения о функционировании рибосомы и его изменениях при тех или иных воздействиях на неё, не сообщая при этом почти ничего о структурных основаниях наблюдаемых явлений. С другой стороны, структурные методы исследования рибосомы — рентгеноструктурный анализ и криоэлектронная микроскопия — сообщают исследователю весьма точные сведения о структуре рибосомы и её комплексов с разнообразными лигандами в тех или иных её функциональных состояниях, мало говоря при этом о подвижности остатков и целых

структурных элементов рибосомных белков и РНК.

Разрешить возникающее затруднение помогает метод молекулярной динамики, который позволяет моделировать движение крупных макромолекулярных комплексов, находящихся в растворе. Хотя рибосома и является крайне сложным объектом, метод молекулярной динамики многократно применялся к описанию динамических аспектов структуры и функционирования как целой рибосомы, так и её частей, как то будет показано далее (см. 2.3). Расчеты молекулярной динамики предоставляют информацию о движении остатков биополимеров рибосомы и о межмолекулярных взаимодействиях, определяющих это движение, увязывая воедино макроскопически наблюдаемые явления в функционировании рибосомы, структурные механизмы этих явлений и определяющие эти механизмы физико-химические процессы и, таким образом, формируя целостное и многоуровневое представление о работе рибосомы.

Интересным объектом для приложения метода молекулярной динамики является рибосомный туннель, канал, по которому из пептидилтрансферазного центра рибосомы в цитоплазму выходит синтезируемая полипептидная цепь. Рибосомный туннель является важным функциональным элементом рибосомы, обеспечивающим не только выход синтезируемой полипептидной цепи, но и образование ею элементов вторичной структуры и регуляцию трансляции. Кроме того, рибосомный туннель является мишенью ряда действующих на рибосому антибиотиков. Выполнение этих функций предполагает, что рибосомный туннель, как и рибосома в целом, является динамической системой, способной реагировать на проходящую по нему пептидную цепь и связывающиеся в нем антибиотики. Особый интерес к рибосомному туннелю и его динамическим свойствам создает то обстоятельство, что рибосомный туннель большей своей частью составлен из остатков 23S рибосомной РНК, так что именно динамические свойства нуклеотидных остатков должны определять динамические свойства рибосомного туннеля. Таким образом, рибосомный туннель, если смотреть на него через призму метода молекулярной динамики, оказывается как бы моделью рибосомы: системой, чье динамическое поведение, чья реакция на какие-либо воздействия, возможно опосредуемая аллостерической передачей сигналов, осуществляется главным образом за счет рибосомной РНК. В силу этого моделирование молекулярной динамики рибосомного туннеля позволяет, кроме исследования некоторых сторон его функционирования, отработать приемы молекулярно-динамического исследования рибосомы вообще.

Целью настоящей работы было молекулярно-динамическое исследование

рибосомного туннеля и связывающихся в нем антибиотиков. При её осуществлении было смоделировано движение рибосомного туннеля рибосомы *E. coli* дикого типа, несущей некоторые мутации или адаптивную химическую модификацию одного из нуклеотидных остатков 23S рРНК. Также были смоделированы комплексы тилозина и его производных, эритромицина и его производных, линезолида, клиндамицина и хлорамфеникола.

Глава 2

Обзор литературы

2.1 Строение рибосомы и рибосомного туннеля. Функционирование рибосомы.

2.1.1 Строение бактериальной рибосомы

Рибосома является органеллой нуклеопротеидной природы, осуществляющей синтез белка согласно программе, содержащейся в матричной РНК (мРНК). Субстратами для рибосом служат аминоксил-тРНК, переводящие с помощью генетического кода текст, записанный в нуклеотидной последовательности мРНК, в последовательность аминокислот. Первые сведения о существовании рибосом были получены в 1940 году, когда А. Клод выделил из животных клеток частицы, более мелкие, чем митохондрии и лизосомы [10]. Настоящим открытием рибосом считают работу Джорджа Паладе [11], который методом электронной микроскопии обнаружил в клетках крыс и куриц плотные гранулы, рассеянные в цитоплазме и закрепленные на эндоплазматическом ретикулуме. Прямое участие этих частиц в биосинтезе белка было окончательно доказано к концу 1950-х годов [12]. Размеры и форма рибосом были вначале охарактеризованы методами электронной микроскопии [13–17]. Получение же атомной структуры рибосом было затруднено высокой сложностью их кристаллизации. Лишь в 1980 г удалось получить кристаллы 50S субъединиц рибосомы *Bacillus stearothermophilus* [18], а в 1989 г приступить к рентгеноструктурному изучению кристаллов целых рибосом *Thermus thermophilus* [19; 20]. Карта электронной плотности большой субъединицы рибосомы *Haloarcula marismortui* была получена лишь в 1998 г [21], и, наконец, в 2000 г удалось построить полноатомную трехмерную

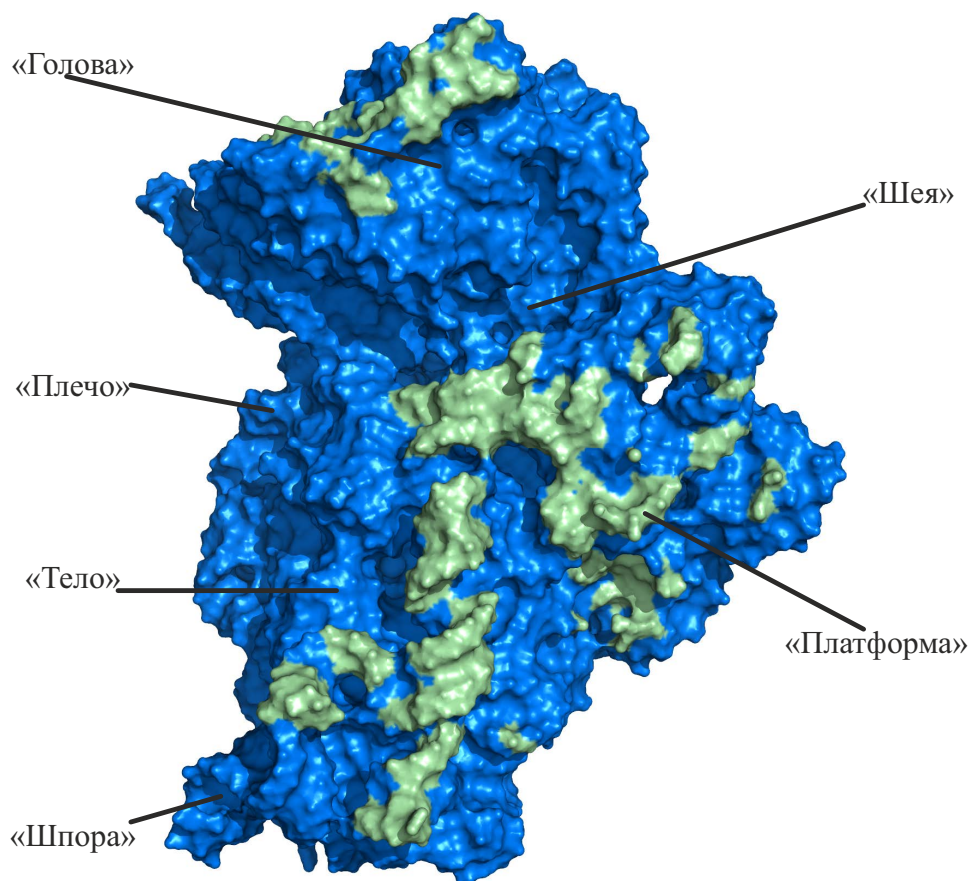


Рис. 2.1. Малая субъединица прокариотической рибосомы (по [25]). Зеленым показана область на «платформе», непосредственно соприкасающаяся с большой субъединицей.

модель бактериальной рибосомы [22—24].

Бактериальные рибосомы имеют линейные размеры около 25 нм и состоят из двух субъединиц неравных размеров: большая субъединица примерно вдвое больше малой. При аналитическом ультрацентрифугировании рибосомы, в зависимости от концентрации ионов магния, осаждаются либо целиком с коэффициентом седиментации 70S, либо распадаются на субъединицы, имеющие коэффициенты седиментации 30S (малая субъединица) и 50S (большая субъединица). Молекулярная масса типичной прокариотической рибосомы составляет $2,5 \cdot 10^6$ Да.

Малая субъединица прокариотической рибосомы (30S) имеет линейные размеры около 23×12 нм. Она построена из одной молекулы 16S рРНК длиной около 1500 остатков и 21 белка (S1-S21). Морфологически в ней выделяется т.н. «тело», «голова» и «платформа», которой малая субъединица соприкасается с большой (Рис. 2.1). «Тело» малой субъединицы через «шею» связано с «головой», содержащей А, Р, Е-сайты, в которых при трансляции находятся, соответственно, аминоацил-тРНК, пептидил-тРНК и пустая тРНК.

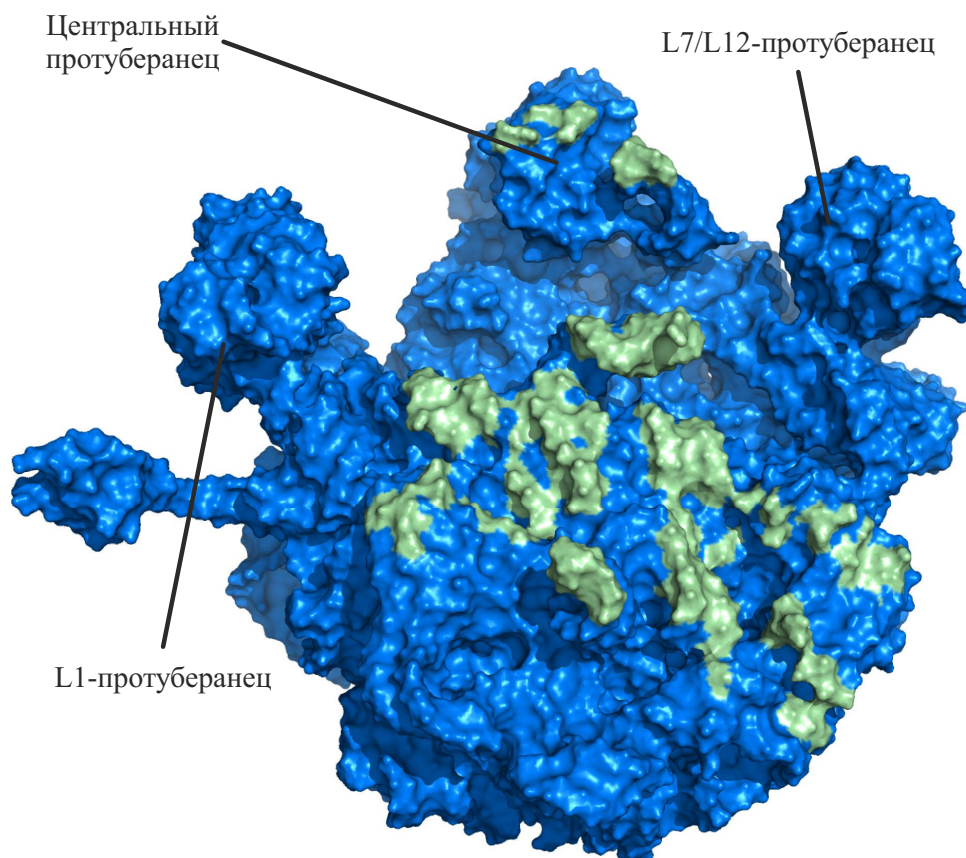


Рис. 2.2. Большая субъединица прокариотической рибосомы (по [25]).

Большая субъединица (50S) имеет линейный размер около 20-23 нм и по форме близка к полусфере с тремя выступами. Её образуют 23S рРНК (2900 нуклеотидных остатков), 5S рРНК (120 нуклеотидных остатков) ¹ и, в случае *E. coli*, 34 белка (L1-L34). Морфологически в большой субъединице выделяется «тело», от которого отходят т.н. L1-протуберанец, центральный протуберанец, образованный, в частности, 5S рРНК и ассоциированными с ней белками, и L7/L12 протуберанец (Рис. 2.2). На «теле» большой субъединицы имеется плоская поверхность, с которой соприкасается «платформой» малая субъединица. При основании центрального протуберанца расположен доступный с поверхности пептидилтрансферазный центр (ПТЦ) [27–30], от которого начинается рибосомный туннель (РТ), пронизывающий всю большую субъединицу.

Ядром структуры обеих субъединиц является РНК, свернутая во вторичную структуру — множество коротких двойных спиралей, примерно 150, разделенных

¹С 5S рРНК млекопитающих связан интересный факт: её D-петля способна координировать ион свинца, приобретая при этом способность расщеплять другие молекулы РНК. С этим связывают токсичность ионов свинца [26]

одноцепочечными участками (Рис. 2.3). Свернутые подобным образом рРНК укладываются в плотные глобулярные третичные структуры, что наиболее характерно для 23S рРНК. Необходимо заметить, что рибосомные РНК содержат несколько десятков модифицированных оснований [31–33], положение которых в цепи рРНК было установлено экспериментами по масс-спектрометрии продуктов расщепления рРНК РНКазой H в присутствии комплементарных исследуемым участкам олигодезоксирибонуклеотидов. Значительную часть модифицированных остатков составляет псевдоуридин.

Глобулярные части рибосомных белков располагаются по периферии рибосомы; исключением является белок малой субъединицы S12, чья С-концевая часть заходит в зону межсубъединичного контакта, а N-концевая часть проходит через всю малую субъединицу. В рибосоме белки в основном выполняют структурную функцию.

Структура рибосомы удерживается тремя типами взаимодействий. Во-первых, это «магниевые мостики» — ионы магния, скоординированные одновременно двумя фосфатными группами, при этом иногда ионы магния организуются в группы по два и по три.

Во-вторых, водородные связи между нуклеотидными остатками, принадлежащими разным элементам вторичной структуры. Часто такие связи образует адениновое основание, внедряющееся в малую бороздку двойной спирали и образующее водородные связи с 2'-гидроксильными группами или самими основаниями GC-пары — т.н. А-минорное взаимодействие (от minor groove — малая бороздка) [34].

В-третьих, это взаимодействия рРНК с рибосомными белками. Во вторичной структуре рРНК присутствует особый мотив, называемый К-поворотом, с которым взаимодействуют белки. Малая субъединица содержит два таких фрагмента, большая — шесть. К-поворот представляет собой асимметричную петлю, внедренную в двойную спираль, с одной стороны фланкированную GC-парами, с другой — GA-парами, содержащую А-минорное взаимодействие между спиральями. К-поворот меняет направление спирали примерно на 60 градусов [35] (Рис. 2.4). Сама петля образована последовательностью GAA, где первый гуанозин образует водородную связь с одним из фланкирующих аденозинов, второй аденозин формирует стэкинг-взаимодействие с фланкирующим гуанозином, а третий аденозин торчит в сторону.

За пятнадцать лет, прошедших с получения первой трехмерной модели рибосомы, методом рентгеноструктурного анализа было получено множество таких моделей со всё улучшающимся разрешением. Наивысшее разрешение было достигнуто в

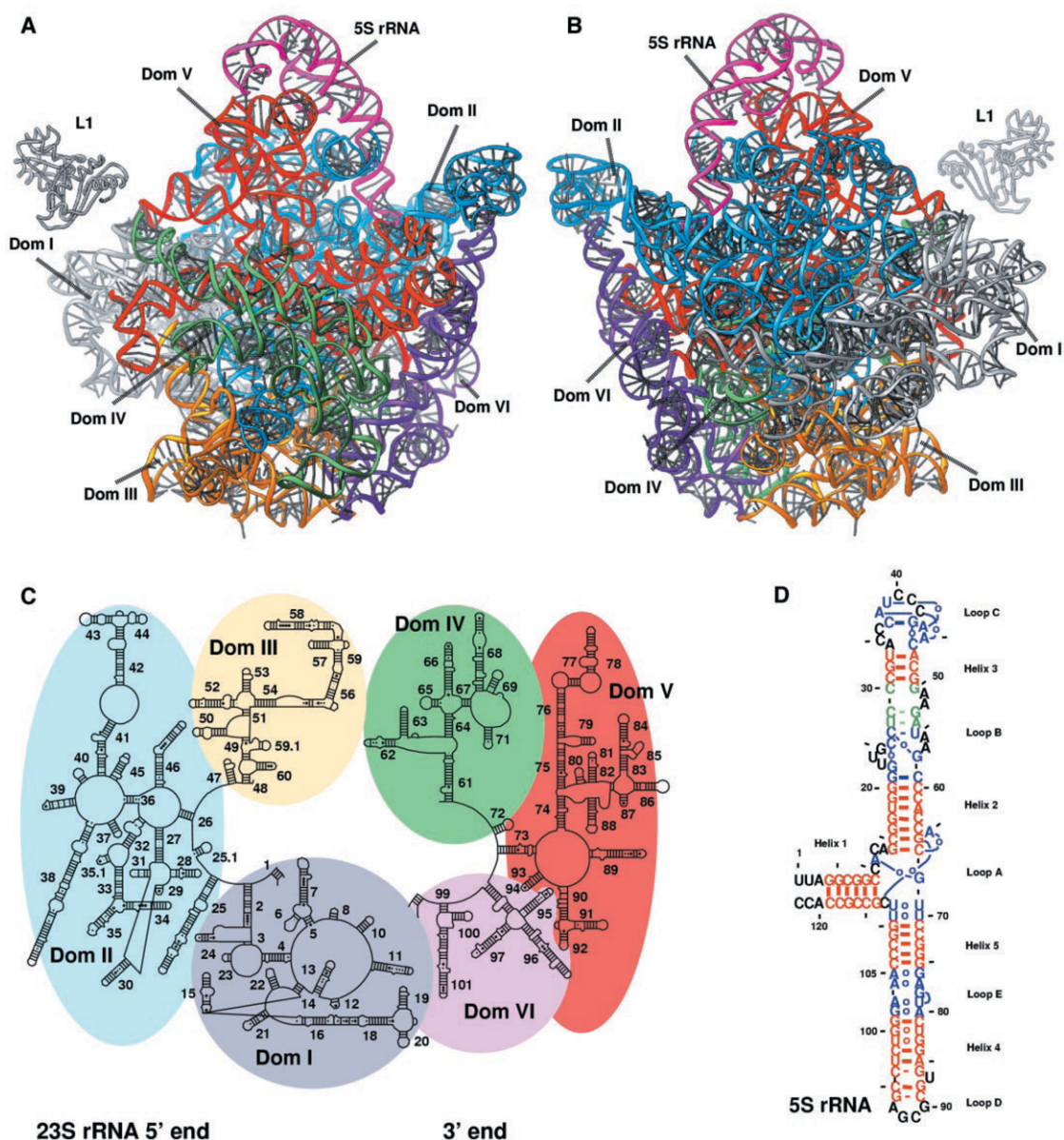


Рис. 2.3. Схематическое изображение третичной и вторичной структур рРНК большой субъединицы рибосомы *H. marismortui*. А, В. Структура рРНК внутри самой субъединицы. Цветом и стрелками обозначены домены (Dom I-VI). С. Вторичная структура 23S рРНК с принятой нумерацией спиралей. D. Вторичная структура 5S рРНК. Цветом обозначены пары нуклеотидов, филогенетические предсказания относительно которых различаются: красным – предсказанные и подтвержденные, синим – найденные, но не предсказанные, зеленым – предсказанные, но не обнаруженные в структуре [22].

2015 году в работе Носке [36] на рибосоме *Escherichia coli* (2,1Å) и в работе [37] на рибосоме *Thermus thermophilus* (2,3Å). Достигнутое разрешение позволило вписать в модель рибосомы структуры модифицированных оснований. Можно отметить и тот любопытный факт, что в структуре из [37] в белке S4 обнаружен железосерный кластер, назначение которого неясно. Невозможно умолчать о важном достижении — получении трехмерной модели рибосомы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, то есть рибосомы эукариотической клетки [38] (хотя это и мало относится к теме главы).

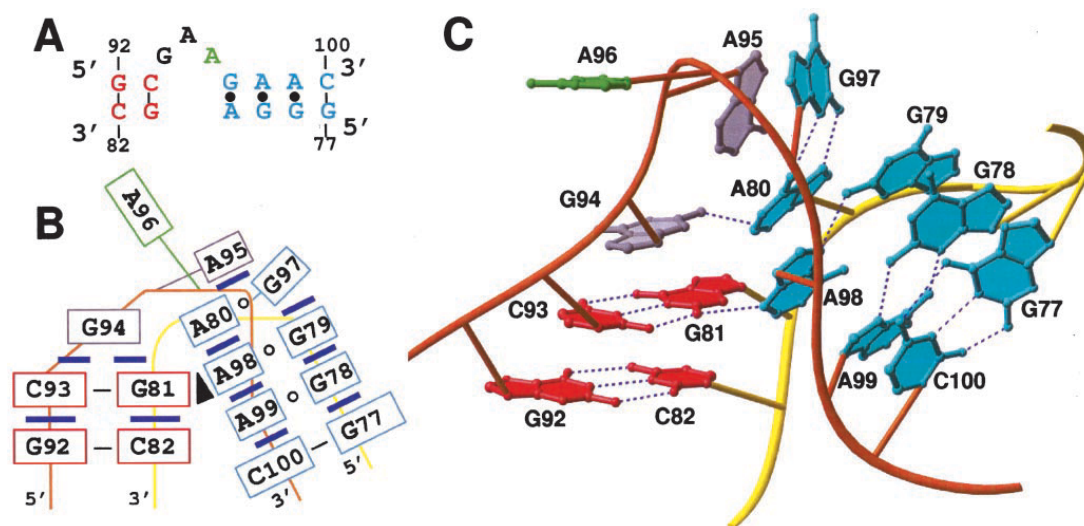


Рис. 2.4. Структура седьмого К-поворота рибосомы *Haloarcula marismortui*, расположенного в 23S рРНК. (а) Вторичная структура. (б) Спаривание и стэкинг-взаимодействие оснований в К-повороте. Черным треугольником обозначено А-минорное взаимодействие (с) Трехмерное изображение К-поворота. Сахарофосфатный остов изломанной цепи показан оранжевым, неизломанной—желтым. Пунктиром показаны водородные связи [35].

Для исследования структуры рибосомы применялись и методы криоэлектронной микроскопии, предполагающие восстановление электронной плотности биополимера по множеству его изображений в разных ориентациях, полученных сквозным просвечиванием электронным пучком включающего исследуемый объект стекловидного льда при криогенных температурах [39]. Первая структура рибосомы, полученная этим методом, относится к 2003 году [40] и имеет разрешение 14Å. Наивысшее разрешение — 2,8Å— достигнуто в работе [41] благодаря прямой детекции электронов, коррекции сферических аббераций электронной оптики и совершенному алгоритму сортировки изображений, используемых для восстановления электронной плотности. Высокое разрешение, в частности, сделало заметными в карте электронной плотности модифицированные основания. Эта работа служит также характерным примером приложения метода криоэлектронной микроскопии к исследованию структуры рибосомы: в ней получена структура комплекса рибосомы с элонгационным фактором Tu, аминокислот-тРНК и антибиотиком. Криоэлектронная микроскопия, в отличие от рентгеноструктурного анализа, не требует получения кристаллов исследуемого объекта и анализирует отдельные молекулы, а не их ансамбли, что позволяет изучать структуру едва ли кристаллизуемых комплексов рибосомы с транспортными РНК, матричными РНК и разнообразными трансляционными факторами. Этот метод позволяет исследовать и конформацию пептида в рибосомном туннеле и их взаимодействия, как в [42]. Наконец, применение криоэлектронной микроскопии позволило построить

трехмерную модель структуры митохондриальной рибосомы [43] с разрешением 3,5Å, что едва ли было возможно с помощью рентгеноструктурного анализа из-за крайней сложности их выделения в достаточном для выращивания кристаллов количестве и с достаточной для этого чистотой.

2.1.2 Функционирование рибосомы.

Как было сказано выше, задача рибосомы состоит в синтезе белка по программе, находящейся в матричной РНК. Этот процесс называют трансляцией. Функции субъединиц рибосомы по отношению к трансляции различны. Малая субъединица отвечает за связывание мРНК и верное распознавание антикодонами аминоксил-тРНК кодонов мРНК. Большая субъединица осуществляет образование новой пептидной связи—пептидилтрансферазную реакцию.

Пептидилтрансферазная реакция протекает в пептидилтрансферазном центре, расположенном в начале рибосомного туннеля. Его образуют петли А (концевая часть спирали 92: нуклеотиды U2552 — C2556) и Р (концевая часть спирали 80: нуклеотиды U2249 — G2255) [44—46] и т.н. «пептидилтрансферазное кольцо» — нуклеотиды A2451, U2506, U2585 и A2602. ПТЦ полностью построен из нуклеотидных остатков, большинство из нуклеотидов высококонсервативны, а 23S рРНК упакована столь плотно, что напоминает активный центр белковых ферментов (Рис. 2.5). Таким образом, рибосома является рибозимом.

Процесс трансляции у прокариот включает три основных этапа: инициацию, элонгацию и терминацию [47] (Рис. 2.6).

Инициация трансляции начинается со связывания свободной 30S субъединицей фактора инициации IF3. Получившийся комплекс затем связывает мРНК, факторы инициации IF1 и IF2 и инициаторную аминоксил-тРНК—формилметионил-тРНК^{fMet}, давая т.н. 30S инициаторный комплекс. Данные криоэлектронной микроскопии указывают на то, что в нем уже не содержится IF3, а IF2 пролегает через «платформу» малой субъединицы, касаясь своим С-концом акцепторного конца инициаторной тРНК.

Заметим, что для запуска трансляции требуется точно расположить инициаторную тРНК, связанную со стартовым кодоном мРНК, в Р-сайте. У прокариот верное расположение рибосомы вблизи стартового кодона достигается посредством комплементарного взаимодействия 3'-конца 16S рРНК и последовательности

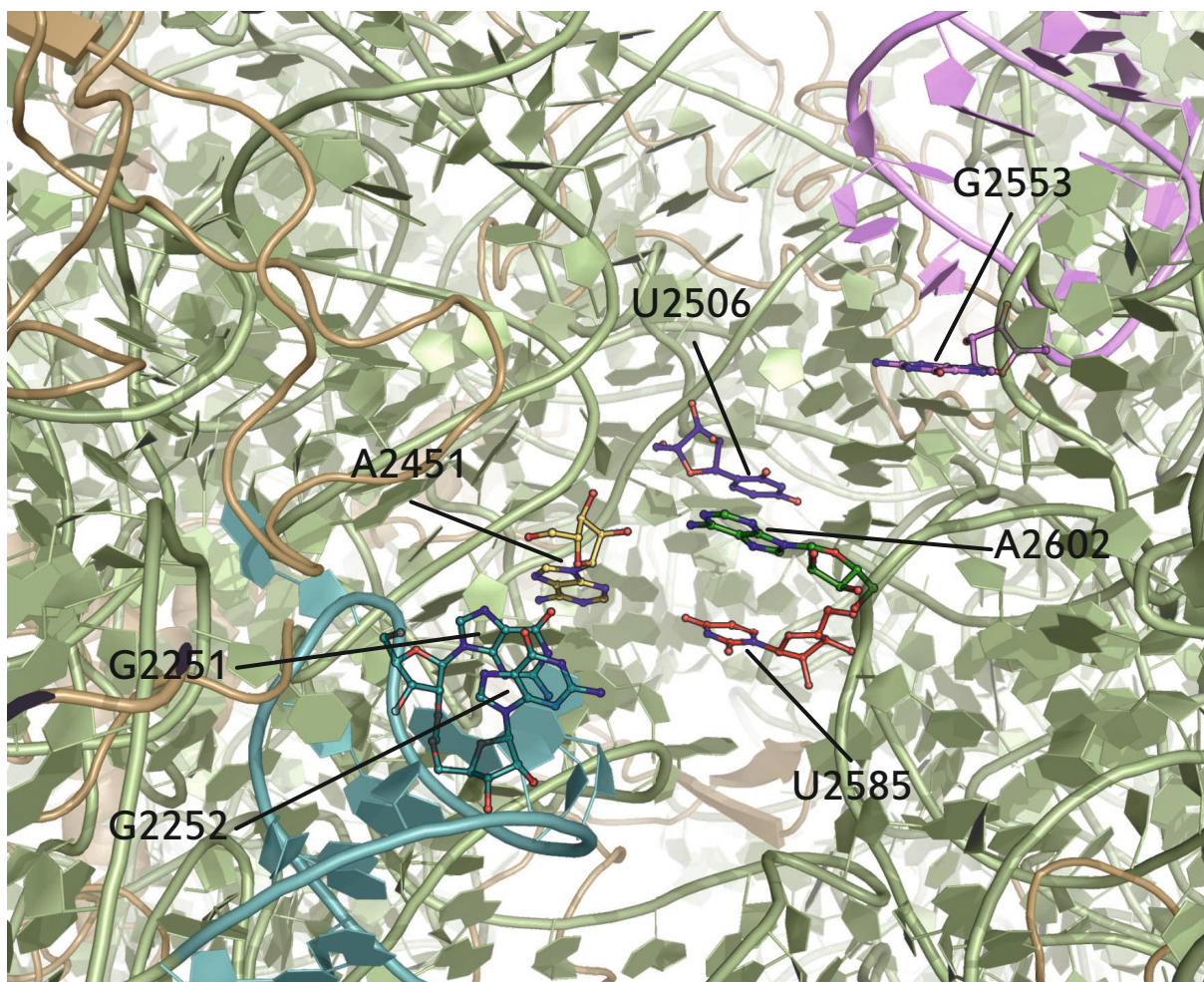


Рис. 2.5. Структура пептидилтрансферазного центра рибосомы *E. coli*. Голубым цветом выделена Р-петля и принадлежащие ей нуклеотиды G2251 и G2253, фиолетовым — А-петля и принадлежащий ей нуклеотид G2553 «Пептидилтрансферазное кольцо»: A2451 — желтый, U2506 — синий, U2585 — красный, A2602 — зеленый.

Шайн-Дальгарно, предшествующей в мРНК стартовому кодону.

Малая субъединица при этом повернута на 4 градуса против часовой стрелки. Далее происходит гидролиз ГТФ до ГДФ и фосфата. После гидролиза IF2 ещё связан с ГТФазным центром большой субъединицы, но уже не контактирует с инициаторной тРНК, которая заняла правильное Р/Р-положение. Затем фосфат высвобождается, факторы инициации диссоциируют от собранной рибосомы.

Собранная рибосома готова к элонгации трансляции. Элонгация представляет собой повторяющиеся шаги, состоящие в последовательном присоединении аминокислотных остатков к полипептидной цепи. В начале каждого шага в Р-сайте рибосомы находится пептидил-тРНК, а А-сайт свободен. Затем происходит декодирование: в А-сайт рибосомы доставляется следующая аминоацил-тРНК в составе комплекса с фактором элонгации EF-Tu и ГТФ.

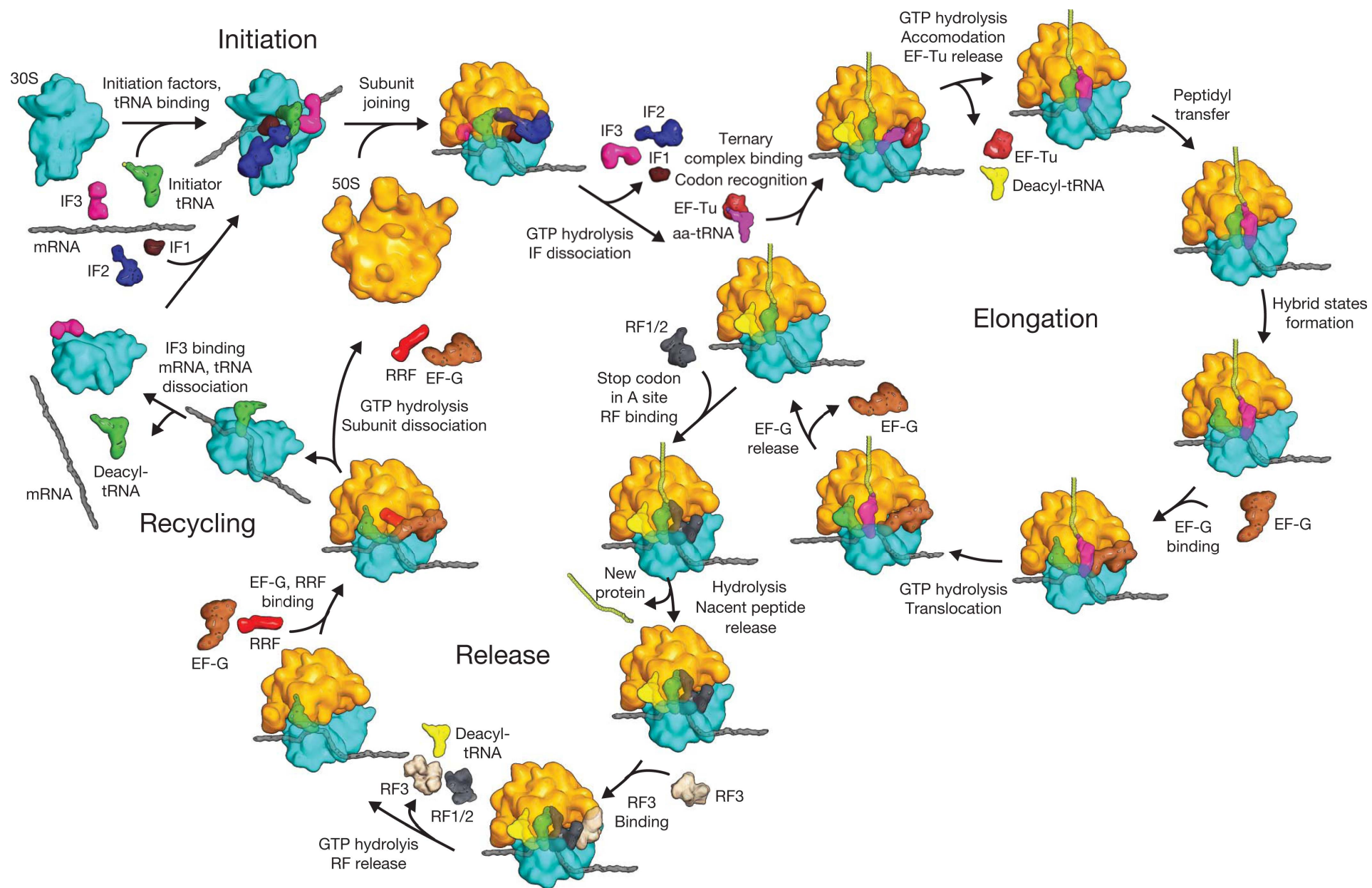


Рис. 2.6. Общая схема трансляции у прокариот (по [47]). Для простоты показаны не все переходные состояния. aa-tRNA — аминоксил-тРНК.

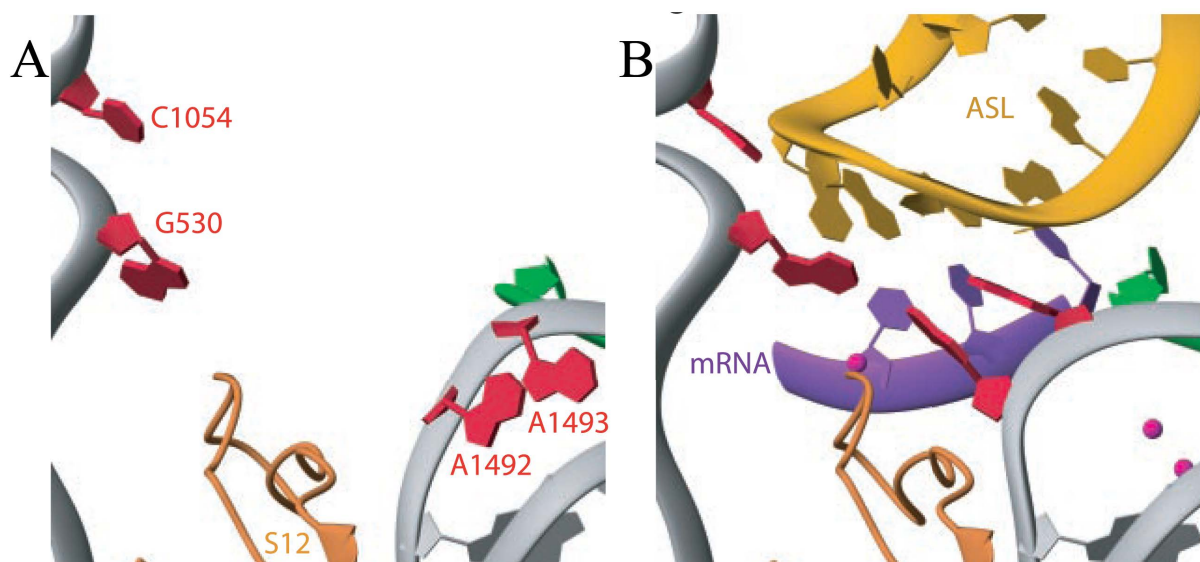


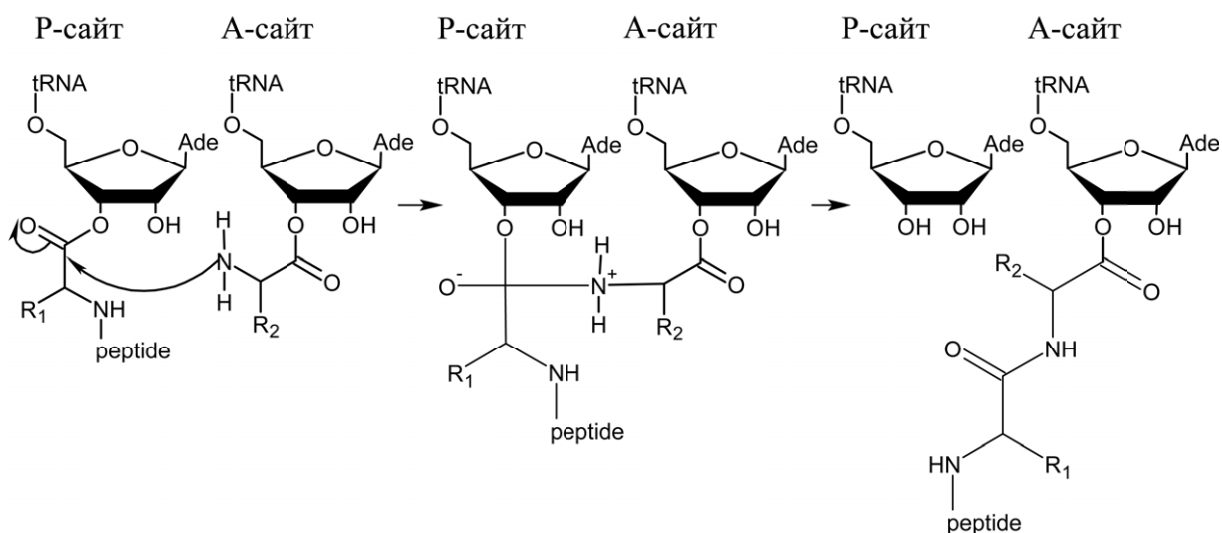
Рис. 2.7. Декодирование тРНК (по [48]). Петля антикодоновой шпильки тРНК — золотистая, кодон мРНК в А-сайте — фиолетовый, в Р-сайте — зеленый, белок S12 — коричневый, консервативные основания 16S рРНК, участвующие в декодировании — красные. А: Малая субъединица без аминоксил-тРНК. А1492 и А1493 уложены в спираль 44 16S рРНК, G530 в син-конформации. В: аминоксил-тРНК связалась в А-сайте. Основания А1492 и А1493 откинулись наружу и взаимодействуют с малой бороздкой кодон-антикодонового дуплекса. G530 переключился в анти-конформацию, чтобы взаимодействовать с А1492, вторым и третьим антикодоном.

Связывание аминоксил-тРНК, соответствующей текущему кодону, приводит к аккомодации—гидролизу ГТФ фактором EF-Tu с последующей диссоциацией от рибосомы и перемещению аминоксиллированного конца тРНК в ПТЦ.

Правильность узнавания тРНК достигается не только за счет спаривания кодона и антикодона, но и через взаимодействие консервативных остатков 16S рРНК (А1492, А1493, G530 и С1054 [48]) с малой бороздкой кодон-антикодонового дуплекса, образованного первыми двумя парами оснований (Рис. 2.7). Энергия образования этих взаимодействий уходит на «закрытие» области малой субъединицы, прилегающей к А-сайту [49], что, как считается, ускоряет следующие этапы декодирования.

Исследования EF-Tu методом криоэлектронной микроскопии показали, что он взаимодействует с «плечом» малой субъединицы. Поэтому «закрытие» домена малой субъединицы, прилегающего к А-сайту может сдвигать «плечо» к «тройному комплексу» аминоксил-тРНК–EF-Tu–ГТФ, возможно, таким образом стабилизируя переходное состояние при гидролизе ГТФ фактором EF-Tu и ускоряя выбор верной тРНК. Мутации или антибиотики, облегчающие «закрытие» домена, понижают точность трансляции, тогда как мутации, затрудняющие этот процесс, увеличивают точность. Кроме того, обнаружилось, что антикодоновый стебель тРНК изгибается так, что её акцепторный конец уходит в ПТЦ. Эта деформация также обеспечивается

энергией связывания тех самых остатков 16S рРНК с малой бороздкой кодон-антикодонового дуплекса. После аккомодации происходит пептидилтрансферазная реакция, в ходе которой α -аминогруппа аминоацил-тРНК атакует карбоксильный углерод пептидил-тРНК с образованием пептидной связи:



Рибосома увеличивает скорость этой реакции примерно на шесть порядков [50]. Механизм катализа заслуживает более подробного рассмотрения.

Поначалу предполагали, что основание A2451, расположенное в ПТЦ, осуществляет общий кислотно-основной катализ, принимая азотом N3 протон у атакующей аминогруппы и передавая его 3'-кислороду аминоацил-тРНК [23; 51]. Однако эксперимент по замене A2451 на другие основания [52] показал лишь небольшое (в разы) падение скорости пептидилтрансферазной реакции, а кристаллические структуры комплексов рибосомы с более точными аналогами переходного состояния более высокого разрешения показали [53], что N3 A2451 не может образовывать водородную связь с атакующей аминогруппой во время реакции. Кроме того, для менее активных аналогов переходного состояния наблюдается зависимость скорости реакции от pH среды, что исключает общий кислотно-основной катализ любым основанием рРНК.

Поэтому сейчас считается, что ускорение пептидилтрансферазной реакции рибосомой основано исключительно на энтропийных факторах—ориентировании субстратов (Рис. 8), экранировании реакции от растворителя и организации активного сайта. Связывание аминоацил-тРНК вызывает конформационные изменения пептидилтрансферазного центра и пептидил-тРНК [54]. Кроме того, расположение

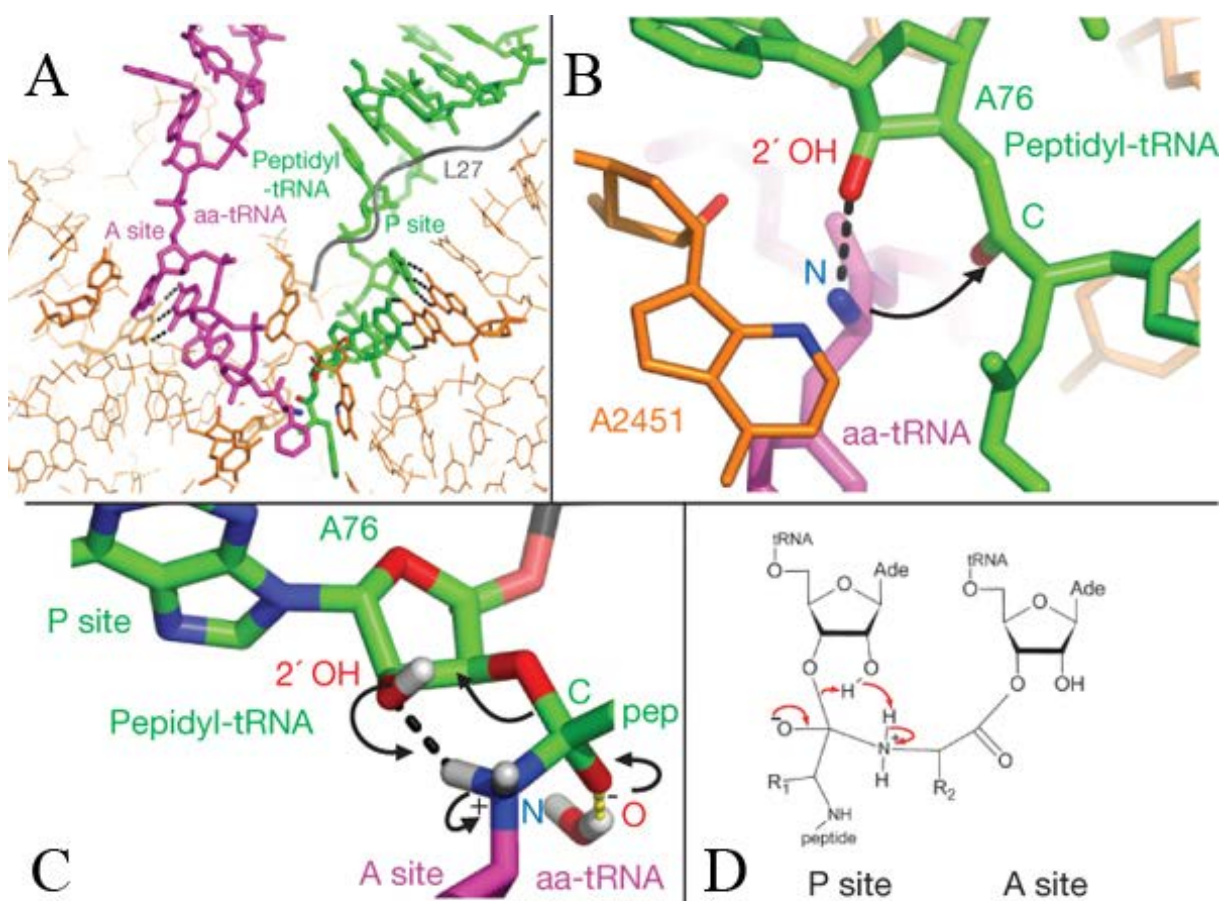


Рис. 2.8. Пептидилтрансферазная реакция (по [47]). А: связывание аминоксил-тРНК в ПТЦ. В: Ориентирование атакующей аминогруппы 2'-гидроксилом А76 пептидил-тРНК и N3 А2451. С, D: Возможный механизм образования пептидной связи, включающий передачу протона 2'-гидроксилом А76 пептидил-тРНК.

молекул воды в ПТЦ фиксировано, что стабилизирует высокополяризованное переходное состояние.

Также обсуждается механизм, включающий согласованный перенос протона 2'-гидроксилом А76 пептидил-тРНК: 2'-ОН одновременно отдает свой протон 3'-кислороду пептидил-тРНК и забирает протон атакующей аминогруппы (Рис. 2.8). В пользу этого механизма говорит близость 2'-гидроксила к образующейся пептидной связи и исчезающей сложноэфирной. Последние исследования [55] свидетельствуют в пользу участия 2-гидроксила в реакции. При этом предполагается более сложный механизм с участием воды: 2-ОН одновременно отдает свой протон воде и забирает протон у атакующей аминогруппы (Рис. 2.9).

Необходимо отметить, что рибосомные белки также участвуют в пептидилтрансферазной реакции. N-концевой участок белка L27 направлена в ПТЦ, где взаимодействует с тРНК [56], белок L16 взаимодействует с акцепторной частью аминоксил-тРНК [57].

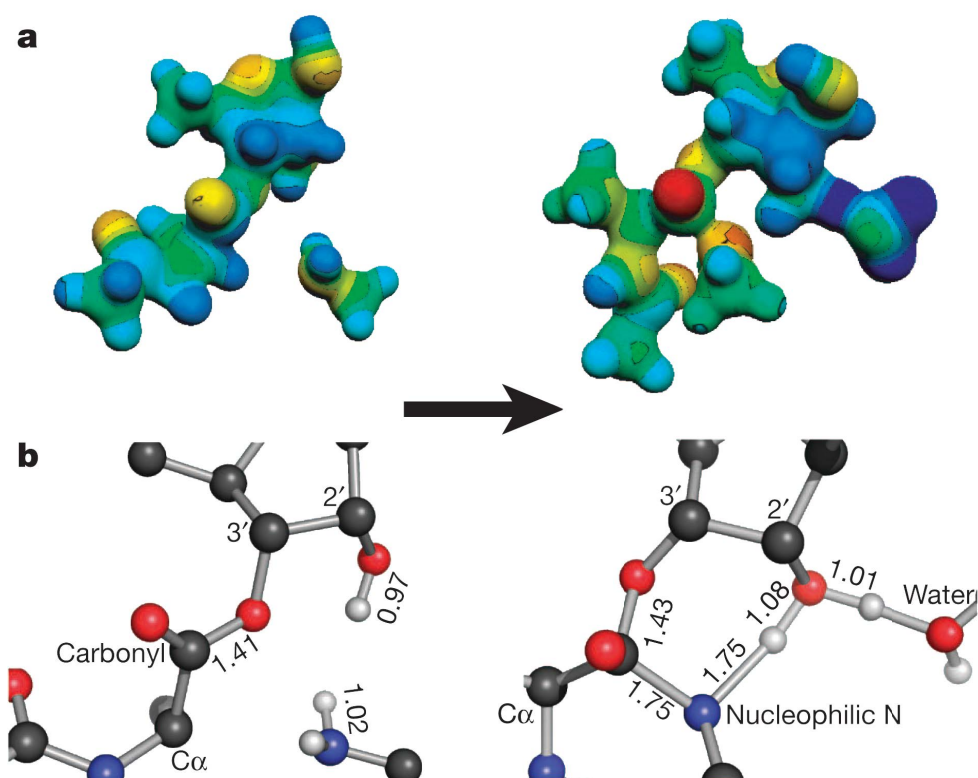


Рис. 2.9. Структуры субстратов и переходного состояния в пептидилтрансферазной реакции [55]. а: Частичные заряды. Обедненные электронами области изображены синим цветом, обогащенные — красным. б: Геометрия. Длины связей даны в ангстремах. Показаны только атомы водорода, принадлежащие аминогруппе, 2'-гидроксилу и воде, остальные скрыты.

Впрочем, главную роль в пептидилтрансферазной активности играет рРНК [58; 59].

После образования новой пептидной связи пептидил-тРНК оказывается в А-сайте, пустая тРНК — в Р-сайте. Чтобы следующий шаг элонгации мог осуществиться, рибосома должна перейти к следующему кодону, А-сайт — освободиться, а пептидил-тРНК занять Р-сайт. Этот процесс называется транслокацией. В ходе транслокации сначала пустая тРНК занимает на большой субъединице Е-сайт, а пептидил-тРНК — Р-сайт, переходя в т.н. гибридные Р/Е и А/Р-состояния соответственно. При этом малая субъединица поворачивается относительно большой на 6 градусов против часовой стрелки. Рибосома блуждает между «повернутым» и «обычным» состояниями до тех пор, пока с ней не свяжется фактор элонгации EF-G, связавший ГТФ, закрепив «повернутое» состояние. Затем EF-G гидролизует ГТФ. При этом пустая тРНК и пептидил-тРНК переходят в Е/Е и Р/Р-состояния соответственно, а малая субъединица поворачивается обратно. Транслокация завершается диссоциацией EF-G от рибосомы.

Элонгация идет до тех пор, пока в А-сайте не окажется стоп-кодон, что запускает

терминацию трансляции. Сначала факторы терминации первого класса (RF1 и RF2 у бактерий) узнают стоп-кодон, причем стоп-кодон UAA узнают оба фактора, а кодоны UAG и UGA — только факторы RF1 и RF2 соответственно. За узнавание кодона UAG в RF1 отвечает мотив Pro-X-Thr, кодона UGA в RF2 отвечает мотив Ser-Pro-Phe. Их связывание приводит к конформационным изменениям оснований G530, A1492 и A1493, причем они отличаются от изменений, происходящих при связывании тРНК: A1493 укладывается на A1913 23S рРНК, образуя новый контакт между субъединицами, а G530 укладывается на третье основание стоп-кодона.

При связывании факторов терминации первого класса содержащийся в них консервативный мотив Gly-Gly-Gln (GGQ) входит в пептидилтрансферазный центр. При этом основание U2585 сдвигается, открывая сложноэфирную связь между вновь синтезированной полипептидной цепью и 3'-концом тРНК, что облегчает нуклеофильную атаку на неё. Механизм гидролиза неясен; известно, что амидная группа глутамин из мотива GGQ, находящаяся в полипептидной цепи, образует водородную связь с 3'-ОН A76 деацелированной тРНК, т.е. с продуктом реакции гидролиза. Возможно, связывание продукта является частью каталитического механизма, хотя замена глутамин на другую аминокислоту приводит лишь к 5 – 10-кратному падению скорости высвобождения синтезированного полипептида. Предполагается, что боковая цепь глутамин и 2'-ОН A76 координируют молекулу воды, атакующую сложноэфирную связь [60] (Рис. 2.10).

Следующим этапом является связывание фактора терминации второго класса RF3 в комплексе с ГДФ. Связывание RF3 с комплексом рибосомы и фактора терминации первого класса стимулирует быстрое высвобождение им ГДФ. Затем RF3 связывает ГТФ с изменением конформации, приводящим к сильному связыванию его с рибосомой и уходу RF1/RF2. Далее RF3 гидролизует ГТФ, его аффинность к рибосоме падает и он высвобождается [61].

Последний этап терминации — диссоциация комплекса большой и малой субъединиц с мРНК и тРНК. Она осуществляется фактором рециркуляции рибосомы RRF вместе с фактором элонгации EF-G. Сначала с рибосомой связывается RRF, затем — EF-G, подобно тому, как он связывается при элонгации, и за счет энергии ГТФ разделяет субъединицы.

Любопытно, что рибосома в состоянии работать без разделения субъединиц. Такую рибосому создали для того, чтобы иметь ортогональную систему трансляции, на которой можно было бы изучать воздействие потенциально летальных мутаций

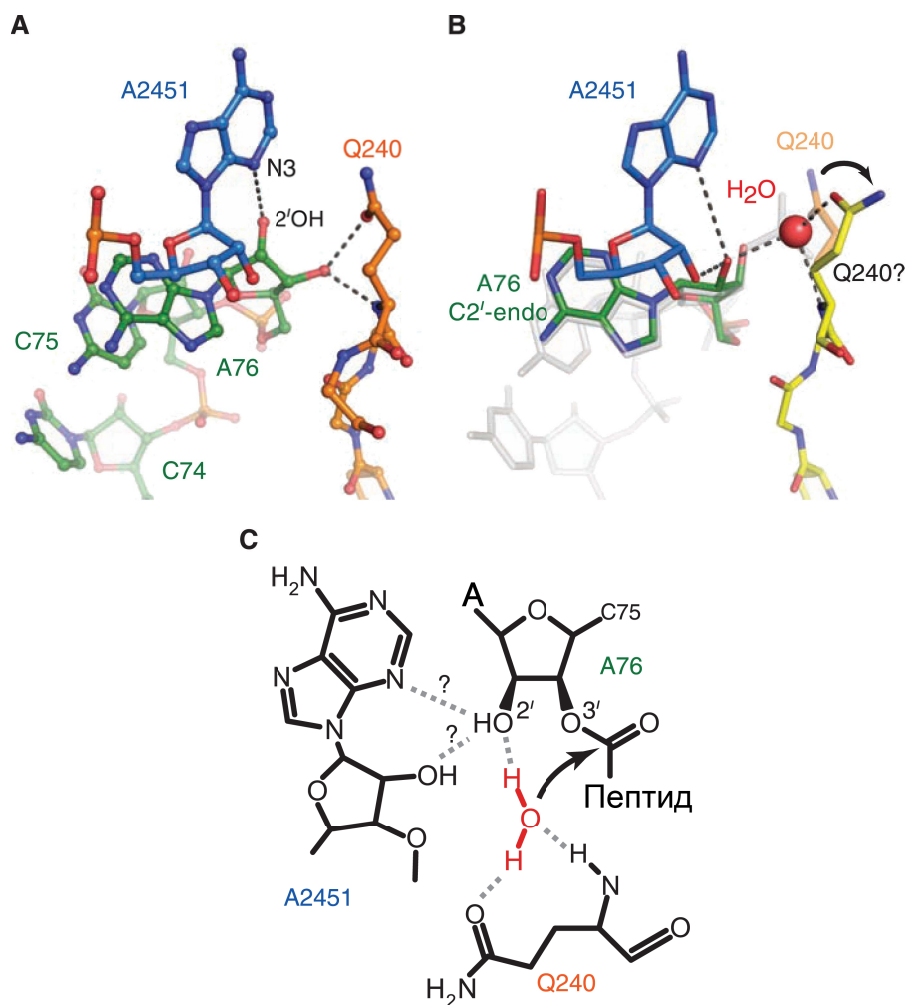


Рис. 2.10. Возможный механизм высвобождения полипептидной цепи (по [49]). А: Взаимодействие Gln-240 RF2 и A2451 23S рРНК. В: Предполагаемая структура, показывающая, как небольшое изменение ориентации Gln-240 позволяет ему координировать молекулу воды. Исходная ориентация показана оранжевым, предполагаемая—желтым. С: Схематическое представление сети взаимодействий между Gln-240, координированной водой, являющейся атакующим нуклеофилом, рибозой А76 тРНК и А2451.

на структуру и функционирование рибосомы и проводить в них другие сильные вмешательства [62]. Для этого 16S и 23S рРНК объединили воедино: естественные начало и конец 23S рРНК соединили короткой шпилькой, а её Н101 соединили в единый дуплекс с h44 16S рРНК, как бы вставив всю 23S рРНК в структуру 16S. Оказалось, что такая гигантская рРНК не только правильно укладывается в третичную структуру и соединяется с белками большой и малой субъединиц, но и способна производить все необходимые бактерии белки. Примером сильного вмешательства в работу механизма трансляции, возможного с такой неразъединяемой рибосомой — трансляция мРНК с измененной последовательностью Шайн-Дальгарно.

Если по какой-то причине матричная РНК не содержит стоп-кодон, то случается серьезный сбой трансляции: нормальной терминации не происходит,

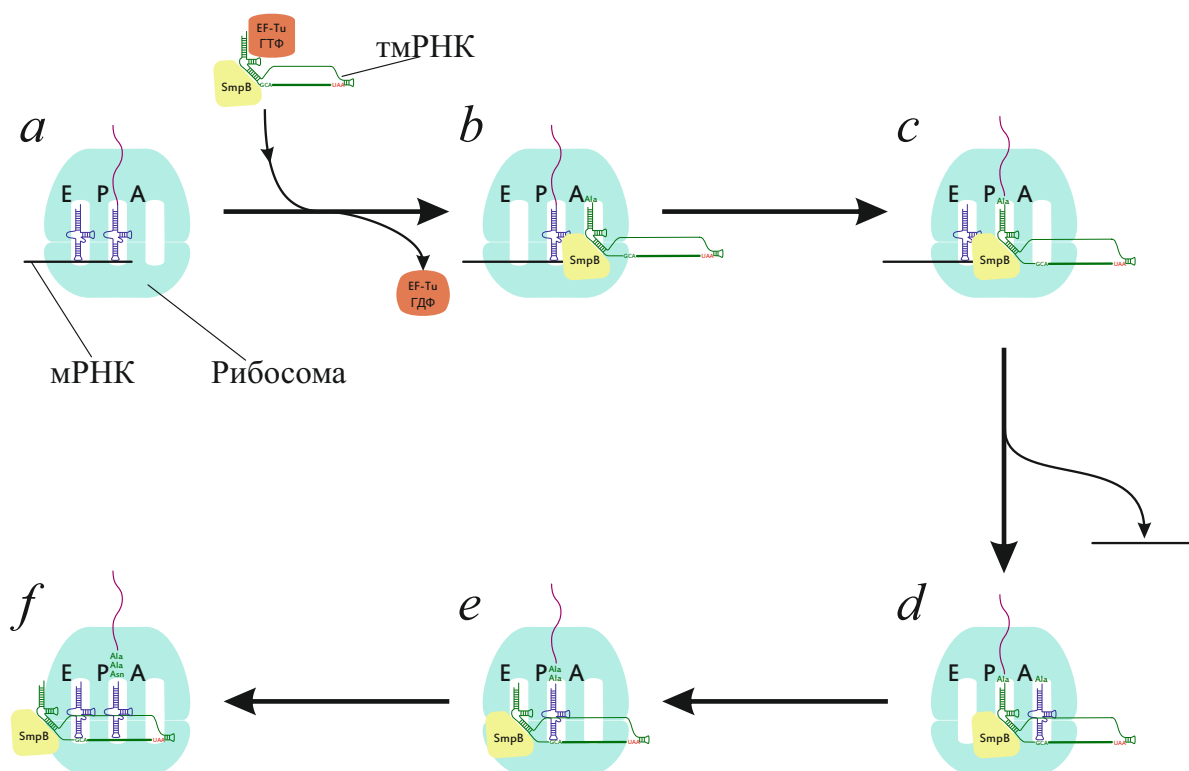


Рис. 2.11. Процесс транс-трансляции. *a*: Рибосома, застрявшая на дефектной мРНК. *b*: Аккомодация тРНК-подобного участка тмРНК в А-сайт. *c*: Перенос пептида на тмРНК. *d*: Замена матрицы на мРНК-подобный участок тмРНК и высвобождение дефектной мРНК. *e*: Аккомодация тРНК в А-сайт. *f*: Элонгация на матрице тмРНК.

а вместо этого рибосома доходит до последнего «кодона» на матричной РНК и останавливается с пептидил-тРНК в Р-сайте. Для разрешения этой ситуации существует так называемая транспортно-матричная РНК (тмРНК) и процесс транс-трансляции (Рис. 2.11). Транспортно-матричная РНК впервые была выделена при электролизе РНК, выделенных из *E. coli* [63]. Её вторичная структура несет на 3'-и 5'-концах участок, подобный тРНК с ССА-последовательностью на 3'-конце, содержит одноцепочечный участок с начальным аланиновым и стоп-кодонами, между которыми закодирован короткий пептид (ANDENYALAA в *E.coli*) и четыре псевдоузла [64]. Получение трехмерной структуры тмРНК затруднено из-за высокой подвижности её мРНК-подобной области; самое высокое разрешение (8,3Å) достигнуто для структуры комплекса тмРНК с рибосомой *E.coli*, полученной методом криоэлектронной микроскопии [65]. Процесс транс-трансляции начинается с того, что тмРНК ацилируется аланином аланил-тРНК синтазой. Аланил-тмРНК образует комплекс с EF-Tu и белком SmpB и в его составе входит своим тРНК-подобным участком в А-сайт рибосомы, после чего рибосома переносит пептид на аланил-тмРНК. После этого происходит транслокация тРНК-подобного участка

в Р-сайт, которая приводит к высвобождению дефектной мРНК с её последующим расщеплением и подмене матрицы мРНК-подобным участком тмРНК. Далее происходит элонгация с последующей нормальной терминацией. При этом на С-конце пептида, синтезированного по сбойной мРНК, нарастает сигнальный пептид, именуемый SsrA-меткой, который распознается и уничтожается так называемыми AAA⁺-протеазами [66].

Впрочем, у *E. coli* имеется и альтернативные системы освобождения рибосомы от дефектной мРНК — белки ArfA и ArfB. Первый связывается с нетранслирующим комплексом и каким-то образом привлекает фактор RF2, который отрезает синтезируемый пептид от тРНК в Р-сайте и таким образом освобождает рибосому, второй, будучи гомологом факторов RF, сам отрезает пептид и высвобождает рибосому [67].

2.1.3 Рибосомный туннель

Рибосомный туннель начинается от пептидилтрансферазного центра и пронизывает насквозь всю большую субъединицу рибосомы. Первые предположения о существовании данной структуры, основанные на том факте, что С-концевые участки белков длиной в 30-40 аминокислотных остатков, синтезируемые рибосомами, не подвержены ферментативному расщеплению, были высказаны в начале 1970-х. Впоследствии существование рибосомного туннеля было подтверждено методами криоэлектронной микроскопии, химического зондирования и, наконец, получением полноатомной трехмерной модели рибосомы [68].

Длина РТ составляет 8-10 нм, средний диаметр — 1,5-2 нм [69]. Он уникален тем, что, в отличие от других клеточных пор и каналов, почти полностью построен из остатков рРНК: стенки туннеля образуют остатки доменов I-V 23S рРНК и β -петли рибосомных белков L4 и L22. Образующие туннель участки рРНК и белки L4 и L22 высококонсервативны.

В РТ выделяется несколько частей. Первая часть простирается от остатка U2620 до остатков G2057, A2058, A2059, A2503, A2061, A2062, образующих сайт связывания макролидных антибиотиков. Её длина 1,8-2 нм. Диаметр туннеля здесь примерно 1,5 нм. Далее туннель изгибается и сужается до

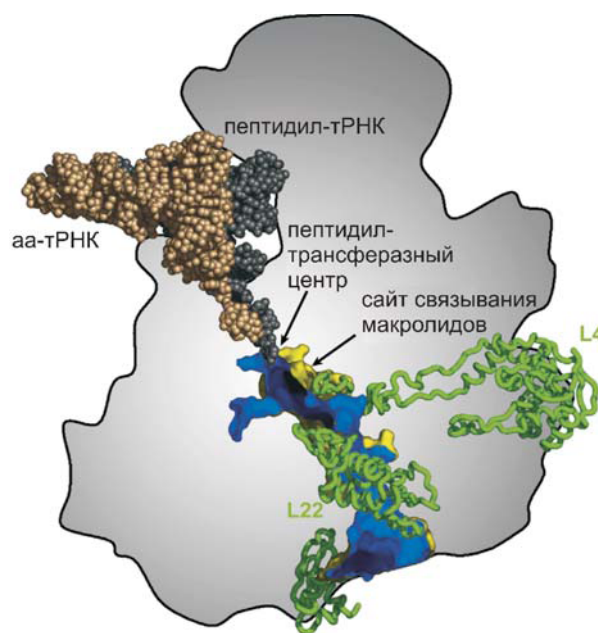


Рис. 2.12. Расположение рибосомного туннеля в большой субъединице рибосомы (разрез вдоль длинной оси туннеля). Синим цветом показана внутренняя поверхность туннеля, желтым — внешняя, зеленым — белки, формирующие внутреннюю поверхность туннеля.

1 нм; это сужение образовано преимущественно остатками белков L4 и L22, содержащими гидрофобные незаряженные группы, способствующие продвижению любых полипептидных цепей [70]. За этим сужением следует вторая часть, имеющая максимальный диаметр до 2,5 нм. Она образована преимущественно остатками I и III доменов 23S рРНК. Далее расположена третья часть рибосомного туннеля— выход, имеющий воронкообразную форму и образованный глобулярной частью белка L22, белками L24, L29 и L32. Белки, расположенные при выходе из рибосомного туннеля, образуют площадку, связывающую белковые факторы и ферменты, участвующие в ранней стадии котрансляционного процессинга синтезируемых белков и транспорте секретрируемых белков к рецепторам на клеточных мембранах. В их число входят шаперон TF (т.н. триггер-фактор) и ассоциированная с ним полипептид-деформилаза, удаляющая формильную группу с N-концевого остатка метионина [71], метионин-аминопептидазы, удаляющие N-концевой остаток метионина, пептидил-пролил-изомеразы и N-ацетилазы [72]. Кроме того, здесь связываются SRP (сигнал-узнающие частицы), отвечающие за перенос рибосомы, вырабатывающей мембранный или секретрируемый белок, на транслокон [73].

Большая часть остатков рРНК, выстилающих туннель, обращена внутрь его своими гетероциклическими основаниями и образует с продвигающейся по туннелю полипептидной цепью водородные связи и гидрофобные контакты. При этом на поверхности РТ отсутствуют протяженные гидрофобные или гидрофильные зоны; их существование крайне затруднило бы прохождение по туннелю ряда последовательностей аминокислот. Сахарофосфатный остов рРНК создает в РТ неравномерно распределенный отрицательный потенциал [74; 75], что наблюдается по затруднению продвижения полиаргининовых или полилизининовых участков в растущей полипептидной цепи. Расчеты энергетического ландшафта в рибосомном туннеле для разных типов аминокислот показывают [76], что для заряженных аминокислотных остатков, типа лизина и аспарагиновой кислоты этот ландшафт содержит множество максимумов и минимумов. На профиль свободной энергии влияет не только заряд, но и размер боковой цепи аминокислотного остатка: крупные остатки, гидрофильные (лизин) и гидрофобные (изолейцин и триптофан), встречают на выходе из туннеля энергетический барьер величиной порядка $5-7 k_B T$ (на один остаток), тогда как для небольших остатков (аланин и аспарагиновая кислота) этот барьер составляет $1-2 k_B T$.

РТ сильно гидратирован и связан с поверхностью большой субъединицы

множеством «микрочаналов», пропускающих воду и гидратированные ионы. По данным молекулярной динамики, вода в рибосомном туннеле частично упорядочена и имеет пониженный коэффициент диффузии [76].

Проходящая по рибосомному туннелю синтезируемая белковая цепь начинает образовывать α -спирали прямо в нём. В развернутой полипептидной цепи на один остаток приходится примерно 0,35 нм длины цепи, а в свернутой в α -спираль— примерно 0,15 нм. Длина рибосомного туннеля составляет около 9 нм, и если бы полипептидная цепь в туннеле была полностью развернута, он бы защищал от ферментативного гидролиза 25 остатков ($9/0,35$), а если бы она была полностью свернута в α -спираль, то 60 остатков ($9/0,15$). Но, как сказано выше, он защищает 30-40 остатков, что говорит о частичном сворачивании цепи. Эксперименты по химическому зондированию пептидов и белков [75; 77; 78] показали, что последовательности аминокислот, образующие α -спирали, действительно принимают в рибосомном туннеле компактную конформацию. При этом свертывание в α -спираль предпочтительно происходит в последней трети рибосомного туннеля, названной поэтому «альфа-зоной». Наконец, образование α -спиралей в «альфа-зоне» было обнаружено методом криоэлектронной микроскопии [79] (Рис. 2.13).

Авторы использовали укороченную (не содержащую стоп-кодона) мРНК, чтобы закреплять в рибосоме пептиды, содержащие в разных местах пятикратный повтор последовательности Glu-Ala-Ala-Ala-Lys, склонный к образованию α -спирали. Если

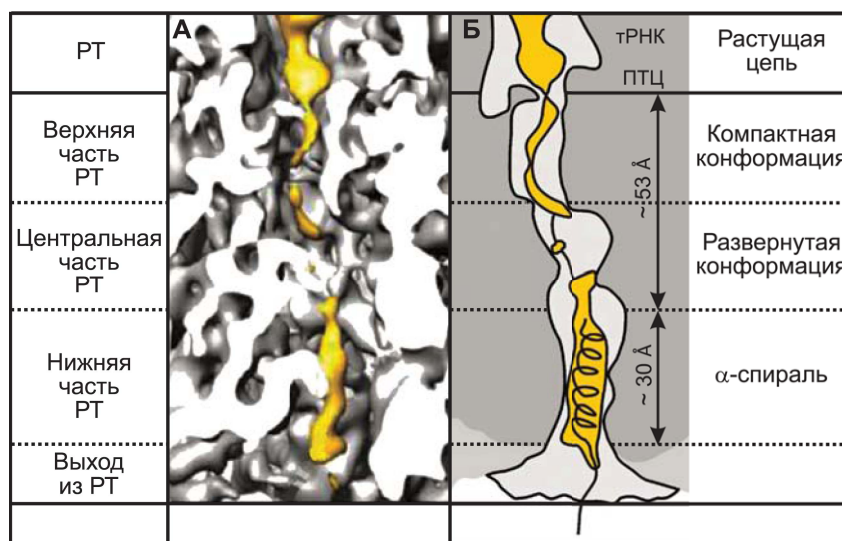


Рис. 2.13. Растущая полипептидная цепь в рибосомном туннеле [79]. А: Распределение электронной плотности полипептида и его окружения в рибосомном туннеле по данным криоэлектронной микроскопии. тРНК и полипептид изображены желтыми. Б: Схематическая интерпретация.

при «заморозке» растущей цепи в туннеле этот повтор оказывался в «альфа-зоне», то он сворачивался в различимую α -спираль, если же он оказывался в центральной части туннеля, то принимал развернутую конформацию. Были обнаружены контакты полипептидной цепи со стенками туннеля и сделан вывод об участии белка L39 в функционировании «альфа-зоны». Образование α -спирали модулируется контактами полипептида с поверхностью рибосомного туннеля.

Рибосомный туннель участвует не только в сворачивании полипептидной цепи, но и в регуляции трансляции. Принцип действия такой регуляторной системы состоит в том, что в мРНК, кодирующей регулируемые белки, участкам функциональных белков предшествует т.н. лидерная последовательность, с которой рибосома начинает трансляцию. Синтезируемый с неё полипептид взаимодействует со стенками туннеля сам по себе, или, что чаще, вместе с низкомолекулярным кофактором [80], останавливая трансляцию. Таким способом осуществляется регуляция генов, отвечающих за секрецию белков (SecA и его лидерная последовательность SecM) [81], катаболизм триптофана [82] и устойчивость к антибиотикам [83].

В качестве примера рассмотрим один из механизмов устойчивости к эритромицину. Ген *ermC* у бактерий кодирует метилтрансферазу типа Erm (erythromycin ribosome methylation), метилирующую основание A2058 в 23S рРНК, что приводит к устойчивости к ряду антибиотиков, включая макролиды. Экспрессия гена регулируется лидерной последовательностью (19 кодонов на расстоянии 65 оснований у *Staphylococcus aureus*). В отсутствие антибиотиков рибосома транслирует только лидерную последовательность, не приступая к трансляции последовательности, кодирующей саму метилтрансферазу, поскольку сайт связывания рибосомы включен во вторичную структуру мРНК (Рис. 2.14А). Когда же антибиотик связывается в рибосомном туннеле, синтез лидерной последовательности останавливается на 9 кодоне, что индуцирует перестройку вторичной структуры мРНК, в результате которой открывается сайт инициации трансляции метилтрансферазы, и биосинтез белка становится возможным (Рис. 2.14В).

Совместное нахождение в рибосомном туннеле эритромицина и стоп-пептида инактивирует пептидилтрансферазный центр. Предполагается, что образование комплекса стоп-пептида с эритромицином приводит к конформационному переходу нуклеотида A2062 из «открытой» (основание направлено во внутреннее пространство туннеля) в «закрытую» (основание лежит вдоль стенки туннеля), вызывающему структурную перестройку в ПТЦ. Нуклеотид A2062 абсолютно необходим для

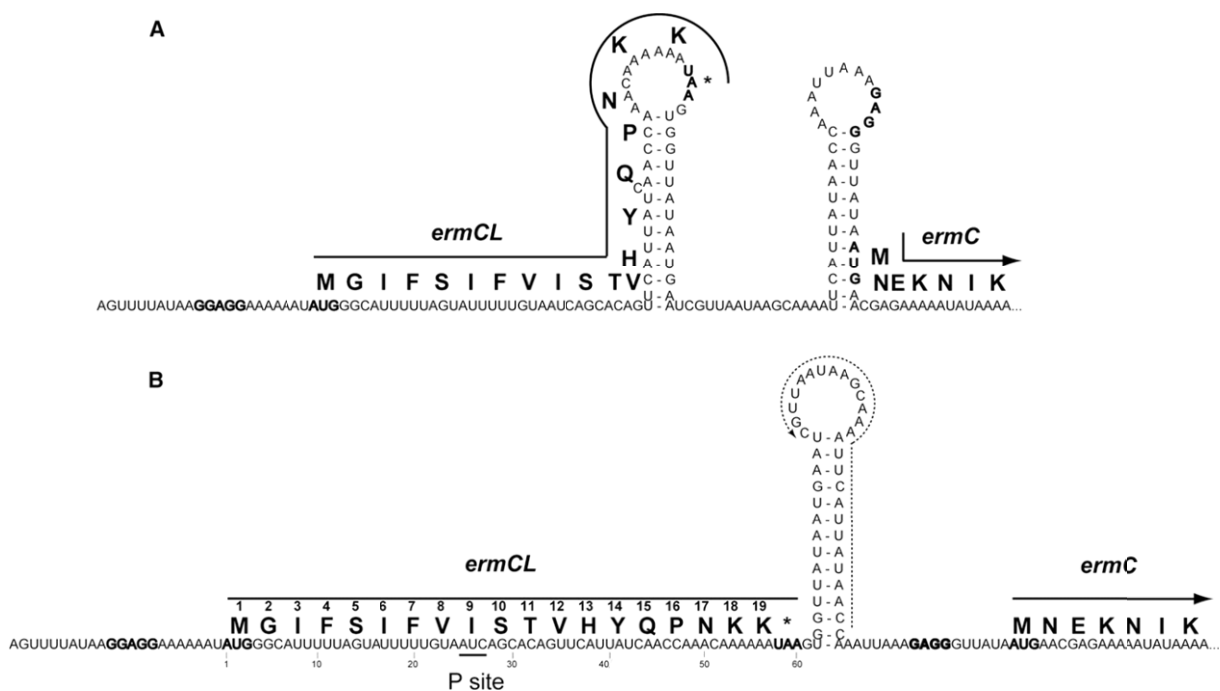


Рис. 2.14. Регуляция экспрессии метилтрансферазы Egm [83]. А: Структура регуляторного участка гена *ermC* в неиндуцированном состоянии. Последовательности Шайн-Дальгарно и старт-кодоны лидерного пептида (*ermCL*) и метилазы (*ermC*) выделены жирным. Аминокислотные последовательности всего пептида *ermCL* и N-конца *ermC* изображены над соответствующими кодонами. В: Структура регуляторного участка в индуцированном состоянии. Кодон, располагающийся в Р-сайте рибосомы в остановленном комплексе, подчеркнут.

запуска трансляции метилтрансферазы, поскольку его замена на С или U приводит к отключению индукции *ermC* антибиотиками. Кроме того, для индукции совершенно необходима С-концевая последовательность Ile-Phe-Val-Ile, причем замена последнего (девятого) изолейцина на структурно близкий валин также отключает её.

В рибосомном туннеле связываются многие антибиотики, например, линкозамиды, оксазолидиноны или макролиды [84]. Рассмотрим последних подробнее. Макролиды — семейство природных и полусинтетических антибактериальных препаратов, в основе структуры которых лежит 12-16-членное лактонное кольцо, к которому присоединены углеводные заместители [85] (Рис. 2.17). Все макролиды имеют углеводный фрагмент из одного или нескольких остатков, присоединенный по пятому положению лактонного кольца, который при связывании макролида с рибосомой ориентируется в сторону пептидилтрансферазного центра. Принцип действия макролидов основан на том, что они препятствуют прохождению синтезируемой пептидной цепи по туннелю. Макролиды не полностью перекрывают просвет туннеля, занимая объем верхней трети туннеля. Связавшая их рибосома производит лишь небольшое число циклов наращивания пептидной цепи с последующей диссоциацией пептидил-тРНК от

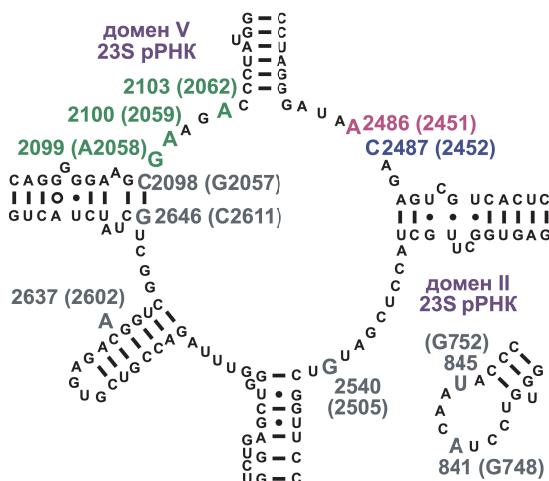


Рис. 2.15. Положение остатков 23S рРНК, формирующих сайт связывания макролидов, во вторичной структуре. Нумерация дана как в 23S рРНК *H. marismortui*. В скобках даны номера остатков в 23S рРНК *E. coli*.

рибосомы. Длина получающихся пептидов зависит от размера молекулы макролида: чем больше макролид, тем короче пептид [86]. Было принято полагать, что такое действие макролидов обусловлено единственно создаваемому ими синтезируемому пептиду стерическим затруднением, однако дальнейшие исследования показали, что, по крайней мере, для 14-членных макролидов это не так. Существуют пептиды, способные проходить мимо связавшегося в рибосомном туннеле макролида, причем эта способность определяется преимущественно аминокислотной последовательностью на их N-конце. Белки, чей синтез не подавляется эритромицином, несут на N-конце последовательность M₁SEALKILNNIR₁₂, причем замена аминокислот с первой по шестую слабо влияет на устойчивость к действию эритромицина. Замена же последовательности I₇LNIR₁₂ подавляет устойчивость к эритромицину [87].

Сайт связывания макролидов находится в рибосомном туннеле, чуть «ниже» ПТЦ, занимая верхнюю треть рибосомного туннеля. Сайты связывания разных макролидов не идентичны, хотя и перекрываются. Расположение макролидного сайта первоначально устанавливали биохимическими и генетическими методами. Химическое зондирование рибосом и их комплексов с макролидами показало, что в формировании сайта связывания макролидов участвуют нуклеотиды центральной петли домена V и шпилька 35 домена II 23S рРНК [88] (Рис. 2.15). Выяснилось, что макролиды защищают от модификации основания A2058 и A2059. Остатки C2611 и G2057, A2572 и U2609 (домен V), G748 и A752 (шпилька 35 домена II), Lys90 (L4) и Gly64 (L22) тем или иным образом причастны к формированию сайта связывания макролидов, что подтверждается химическим зондированием [89–94]. 16-членные

макролиды тилозин и спирамицин препятствуют модификации нуклеотида A2062.

Настоящим прорывом стало получение структур комплексов рибосом с антибиотиками методом рентгеноструктурного анализа. Результаты этих исследований хорошо согласуются с экспериментами по химическому зондированию. Первыми были получены структуры комплексов рибосомы *Deinococcus radiodurans* с хлорамфениколом и эритромицином [95], и *Haloarcula marismortui* с тилозином, спирамицином, карбомицином А и азитромицином [96].

Данные рентгеноструктурного анализа говорят о том, что связывание макролидов, в основном, обусловлено формированием водородных связей и гидрофобных взаимодействий. За образование водородных связей в значительной мере отвечают углеводные остатки — каждый из них образует минимум одну водородную связь с остатками рРНК, так что чем их больше в структуре макролида, тем сильнее его взаимодействие с рибосомным туннелем. Например, 2'-ОН микаминозы в тилозине образует водородную связь с N1 A2058. Гидрофобные же взаимодействия обеспечиваются лактонным кольцом. Его конформация в рибосомном туннеле такова, что все полярные заместители ориентированы по одну сторону плоскости кольца и направлены в объем туннеля, контактируя с водой. Неполярные заместители развернуты в противоположную сторону и формируют гидрофобную поверхность, примыкающую к стенке туннеля. Кроме того, макролиды группы тилозина обратимо образуют ковалентную связь между альдегидной группой C20 и экзоциклической аминогруппой A2062, причем образуется не основание Шиффа, как можно было бы ожидать, а карбиноламин (Рис. 2.16).

Получение структуры комплексов рибосом с макролидами прояснило механизмы устойчивости бактерий к ним. Моно- и диметилирование A2058, осуществляемое метилтрансферазами семейства Egm. Известно около 20 генов метилтрансфераз *erm*, ассоциированных с транспозонами и локализованных и на хромосомах, и на плазмидах. Механизм индукции метилирования описан выше. Метилирование A2058 и G748 приводит к устойчивости по отношению ко всем макролидам, поскольку нарушает образование ими водородных связей с углеводными остатками. Другим механизмом устойчивости к макролидам является замена остатка A2058 на G, что делает поверхность рибосомного туннеля менее гидрофобной и нарушает образование гидрофобного контакта с лактонным кольцом [97]. Чаще всего происходит замена нуклеотида A2062 на C или, реже, другие нуклеотиды, не имеющие аминогруппы, ориентированной должным для связывания с антибиотиками

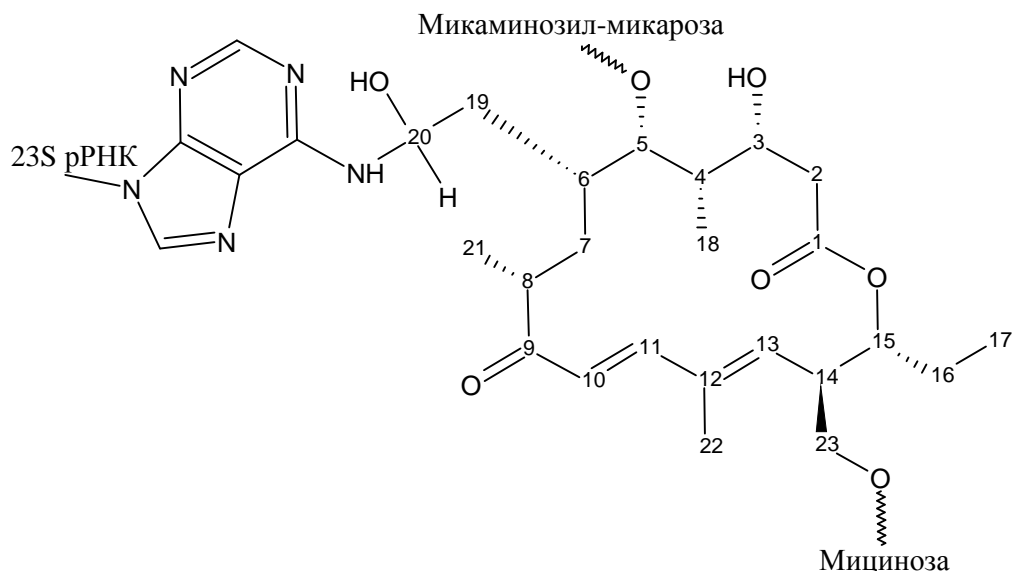


Рис. 2.16. Ковалентное связывание тилозина с экзоциклической амногруппой основания А2062 23S рРНК.

образом. Для макролидов тилозиновой группы такая замена устраняет возможность ковалентного связывания.

2.1.4 Заключение

Как следует из рассмотрения посвященной рибосоме литературы, рибосома вдумчиво изучается биохимическими и структурными методами. Первые позволяют узнать детали функционирования рибосомы, её реакцию на те или иные воздействия; вторые открывают нам детали строения рибосомы на атомном уровне и, в определенной мере, то, как изменяется конформация остатков слагающих рибосому биополимеров в ходе работы рибосомы и в ответ на действие разнообразных эффекторов. Таким образом, структурные и биохимические методы исследования взаимно дополняют друг друга, позволяя увязать в единую схему реакцию рибосомы на некоторые воздействия и структурные основания такой реакции. Однако нужно отметить, что экспериментальные структурные методы, во-первых, дают сведения о статичной структуре рибосомы в тех или иных её функциональных состояниях, во-вторых, едва ли способны показать малоустойчивые переходные состояния рибосомы. Между тем, рибосома является динамической системой, так что в полной мере объяснить данные о функционировании рибосомы изменениями в её структуре можно только учитывая динамические свойства последней, например, некоторым способом узнавая о изменениях характера подвижности остатков образующих

рибосому биополимеров или о совершаемых ими конформационных переходах при передвижениях рибосомы между её функциональными состояниями или в ответ на связывание эффекторов. Следовательно, исследования рибосомы требуют привлечения метода, позволяющего изучать именно динамические свойства рибосомы. Такой метод мы можем найти в моделировании молекулярной динамики.

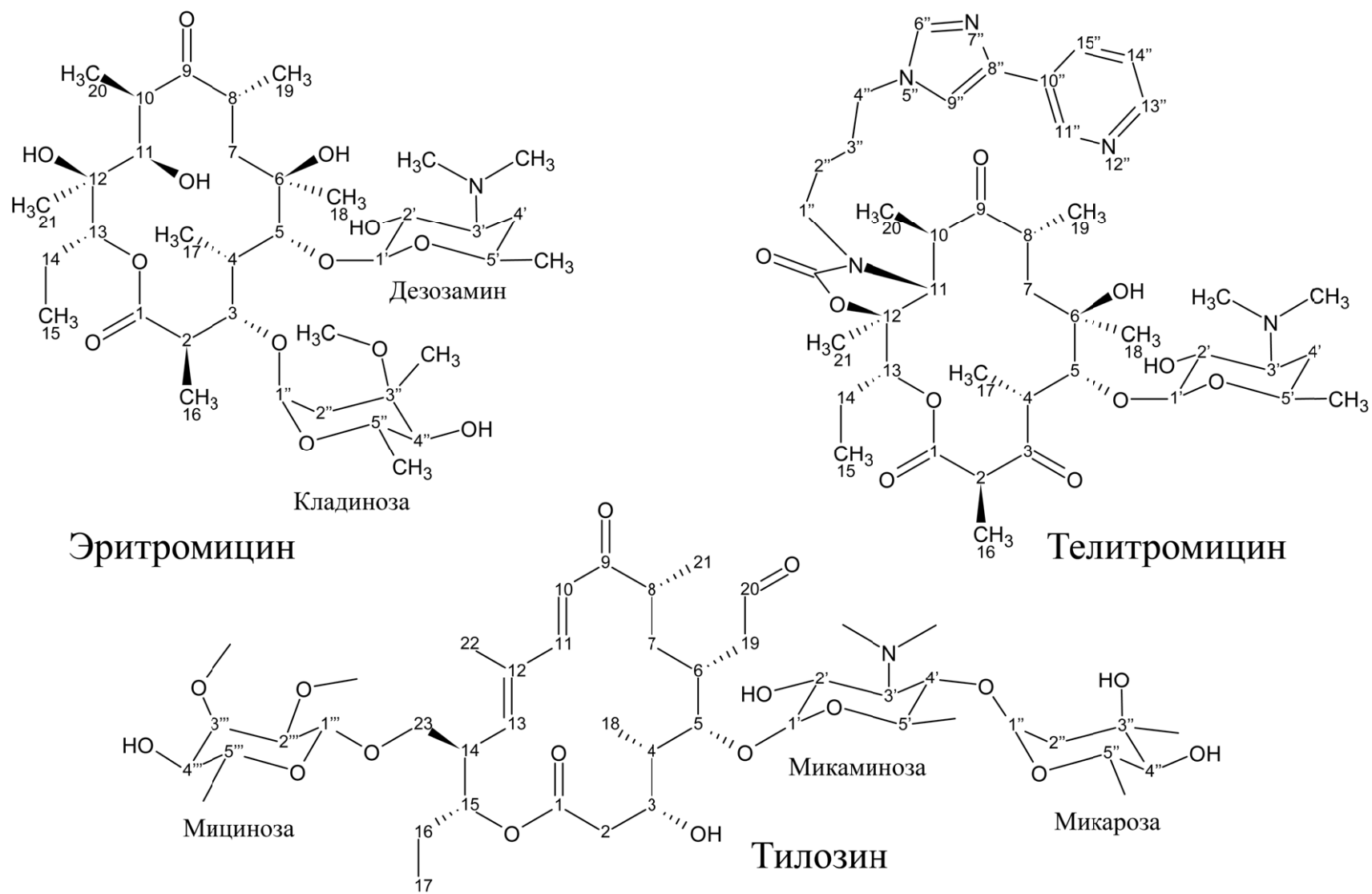


Рис. 2.17. Структуры некоторых представителей семейства макролидов — 14-членного эритромицина и 16-членного тилозина, и кетолидов — телитромицина.

2.2 Метод молекулярной динамики

2.2.1 Основы метода

Метод молекулярной динамики состоит в расчете эволюции молекулярных систем во времени [98]. При этом моделируемые системы могут описываться как классической механикой, так и квантовой. Однако, говоря о молекулярной динамике, обычно подразумевают описание молекулярной системы классической механикой (классический метод молекулярной динамики). Именно этот метод использовался в данной работе и именно он будет описан далее. В классическом методе молекулярной динамики мы моделируем молекулярную систему системой материальных точек, чье движение описывается классическими уравнениями Ньютона:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \mathbf{F}_i, i = 1, \dots, N \quad (2.1)$$

В самом простом случае каждая материальная точка соответствует одному атому. Тогда N —число атомов в системе, m_i —масса, \mathbf{r}_i —радиус-вектор, \mathbf{F}_i —сила, действующая на i -ый атом. Предположим, мы можем вычислять действующие на частицы силы и что они зависят только от взаиморасположения частиц:

$$\mathbf{F}_i = \mathbf{F}_i(r_1, \dots, r_N) \quad (2.2)$$

Силы, действующие на частицы в течение малого интервала времени Δt , можно считать постоянными. И тогда координаты и скорости частиц изменятся за тот же интервал времени мало, согласно уравнению (2.1):

$$\mathbf{v}_i(t + \Delta t) \approx \mathbf{v}_i(t) + \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i} \Delta t \quad (2.3)$$

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) \approx \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}_i(t) \Delta t \quad (2.4)$$

Задавая в начальный момент времени координаты и скорости частиц и умея рассчитывать действующие на них силы, можно рассчитать координаты, скорости и силы через интервал Δt , затем через интервал $2\Delta t$ и так далее. Так рассчитывается траектория движения молекулярной системы.

Практически используют варианты интегрирования Верле. Суть его в том, что

координату $\mathbf{r}(t)$ раскладывают в ряд Тейлора в окрестности произвольного момента времени t_0 , обозначая $\Delta t = t - t_0$:

$$\mathbf{r}(t_0 + \Delta t) = \mathbf{r}(t_0) + \mathbf{v}(t_0) \Delta t + \frac{1}{2} \mathbf{a}(t_0) \Delta t^2 + \frac{1}{6} \mathbf{r}^{(3)}(t_0) \Delta t^3 + O(\Delta t^4) \quad (2.5)$$

$$\mathbf{r}(t_0 - \Delta t) = \mathbf{r}(t_0) - \mathbf{v}(t_0) \Delta t + \frac{1}{2} \mathbf{a}(t_0) \Delta t^2 - \frac{1}{6} \mathbf{r}^{(3)}(t_0) \Delta t^3 + O(\Delta t^4) \quad (2.6)$$

$$\mathbf{a}(t_0) = \frac{d^2 \mathbf{r}(t_0)}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}(t_0)}{m} \quad (2.7)$$

Здесь $O(\Delta t^4)$ обозначает члены четвертого порядка и выше. Складывая уравнения (2.5) и (2.6), получим

$$\begin{aligned} \mathbf{r}(t_0 + \Delta t) + \mathbf{r}(t_0 - \Delta t) &= 2\mathbf{r}(t_0) + \mathbf{a}(t_0) \Delta t^2 + O(\Delta t^4) \\ \mathbf{r}(t_0 + \Delta t) &= 2\mathbf{r}(t_0) - \mathbf{r}(t_0 - \Delta t) + \mathbf{a}(t_0) \Delta t^2 + O(\Delta t^4) \end{aligned} \quad (2.8)$$

уравнение координаты в последующий момент времени. Вычитая уравнение (2.6) из (2.5), получим уравнение для скорости:

$$\begin{aligned} \mathbf{r}(t_0 + \Delta t) - \mathbf{r}(t_0 - \Delta t) &= 2\mathbf{v}(t_0) \Delta t + O(\Delta t^2) \\ \mathbf{v}(t_0) &= \frac{\mathbf{r}(t_0 + \Delta t) - \mathbf{r}(t_0 - \Delta t)}{2\Delta t} + O(\Delta t^2) \end{aligned} \quad (2.9)$$

Сам алгоритм Верле выглядит так:

1. в момент времени $t = 0$ задаются начальные координаты $\mathbf{r}_i(0)$ и скорости $\mathbf{v}_i(0)$ всех частиц
2. вычисляются координаты в момент времени $t = \Delta t$:

$$\mathbf{r}_i(\Delta t) = \mathbf{r}_i(0) + \mathbf{v}_i(0) \Delta t$$

3. по известным координатам всех частиц рассчитываются силы

$$\mathbf{F}_i(t) = \mathbf{F}_i(\mathbf{r}_1(t), \dots, \mathbf{r}_N(t))$$

4. из сил рассчитываются ускорения по уравнению (2.7)
5. вычисляются координаты в следующий момент времени по уравнению (2.8)

Шаги 3-5 повторяются нужное количество раз. Отметим, что скорости явно не вычисляются. Существует более быстрая версия алгоритма Верле—алгоритм с перескоками (leap-frog). Он отличается тем, что за шагом вычисления ускорений следует шаг расчета скорости в момент времени $t + \frac{1}{2}\Delta t$

$$\mathbf{v}_i \left(t_0 + \frac{1}{2}\Delta t \right) = \mathbf{v}_i \left(t_0 - \frac{1}{2}\Delta t \right) + \mathbf{a}_i(t) \Delta t \quad (2.10)$$

По которым рассчитываются координаты в момент времени $t + \Delta t$

$$\mathbf{r}_i(t_0 + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t_0) + \mathbf{v}_i \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) \Delta t \quad (2.11)$$

Значения скоростей «отстают» от значений координат на половину Δt , как бы перескакивая друг через друга. Наконец, скоростной алгоритм Верле рассчитывает на каждой итерации и скорости и координаты в один и тот же момент времени по уравнениям

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}_i(t) \Delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}_i(t) \Delta t^2 \quad (2.12)$$

$$\mathbf{v}_i(t + \Delta t) = \mathbf{v}_i(t) + \frac{1}{2}(\mathbf{a}_i(t) + \mathbf{a}_i(t + \Delta t)) \Delta t \quad (2.13)$$

Действующие в молекулярной системе силы аппроксимируются потенциалами, зависящими от координат всех частиц. Обозначим $U(\mathbf{r}_1(t), \dots, \mathbf{r}_N(t))$ потенциальную энергию моделируемой системы. Из неё рассчитываются действующие на частицы силы:

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial U(\mathbf{r}_1(t), \dots, \mathbf{r}_N(t))}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (2.14)$$

Потенциальная энергия молекулярной системы представляется суммой энергий валентных связей и углов, торсионных углов и плоских групп, ван-дер-ваальсовых и кулоновских взаимодействий.

$$U = U_{\text{связи}} + U_{\text{углы}} + U_{\text{торсионы}} + U_{\text{несобств}} + U_{VdW} + U_{qq} \quad (2.15)$$

Вид потенциалов, описывающих эти энергии, и их параметры подбираются так, чтобы возможно более точно воспроизводить интересующие нас свойства систем (например, макроскопические характеристики — температуру кипения жидкости). Эту совокупность потенциалов и их параметров принято называть силовым полем. Их разработано много. Для моделирования биополимеров чаще всего используют

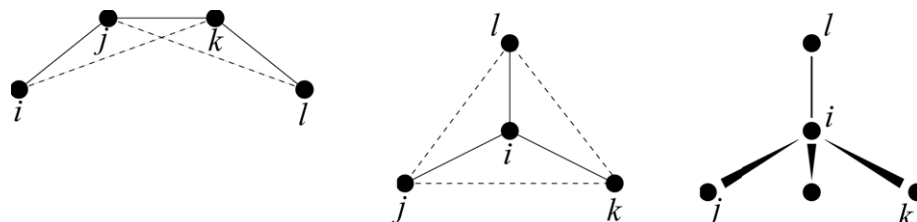


Рис. 2.18. Несобственные двугранные углы. Слева направо: выход из плоскости атомов в кольце, выход из плоскости заместителя при кольце, нарушение тетраэдрического расположения заместителей при атоме. Несобственный двугранный угол есть угол между плоскостями (i, j, k) и (j, k, l) .

силовое поле AMBER [99; 100], которое имеет следующий вид:

$$U_{\text{связи}} = \sum_j K_{l,j} (l_j - l_{0j})^2 \quad (2.16)$$

где l_{0j} — равновесная длина, $K_{l,j}$ —силовая константа j -ой связи;

$$U_{\text{углы}} = \sum_j K_{\theta,j} (\theta_j - \theta_{0j})^2 \quad (2.17)$$

где θ_{0j} —равновесная величина, $K_{\theta,j}$ —силовая константа j -ого валентного угла;

$$U_{\text{торсионны}} = \sum_j K_{\varphi,j} (1 \pm \cos n_j \varphi_j)^2 \quad (2.18)$$

где $K_{\varphi,j}$ —силовая константа j -ого торсионного угла, а n_j —целое число, отражающее симметрию данного потенциала;

$$U_{\text{несобств}} = \sum_j K_{\psi,j} (1 - \cos 2\psi_j)^2 \quad (2.19)$$

где $K_{\psi,j}$ —силовая константа деформации данной группы. Впрочем, здесь может использоваться и квадратичный потенциал, аналогичный (2.17). Роль этой компоненты потенциальной энергии, иногда называемой потенциалом несобственных двугранных углов—задание плоских групп вроде ароматических колец [101] или ассиметрических центров (Рис. 2.18). В последнем случае потенциал предотвращает «выворачивание» молекулы в своего энантиомера.

Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия рассчитываются для пар атомов, между которыми нет валентных связей или валентных углов. Они задаются в виде

модифицированного потенциала Леннард-Джонса

$$U_{VdW} = \sum_{i < j} \sum_j 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] W_{VdW}(r_{ij}) \quad (2.20)$$

где r_{ij} —расстояние между частицами в паре, а σ_{ij} и ε_{ij} —параметры потенциала для частиц данного типа. Для разнотипных частиц они вычисляются по комбинационным правилам

$$\sigma_{ij} = \frac{\sigma_{ii} + \sigma_{jj}}{2} \quad (2.21)$$

$$\varepsilon_{ij} = \sqrt{\sigma_{ii} + \sigma_{jj}} \quad (2.22)$$

Член $W_{VdW}(r_{ij})$ является функцией переключения, ограничивающая радиус действия ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Она гладко сводит потенциал в ноль:

$$W_{VdW}(r_{ij}) = \begin{cases} 1, & r_{ij} \leq R_{on} \\ \frac{(R_{off}^2 - r_{ij}^2)^2 \cdot (R_{off}^2 - 3R_{on}^2 + 2r_{ij}^2)}{(R_{off}^2 - r_{ij}^2)^3}, & R_{on} < r_{ij} < R_{off} \\ 0, & r_{ij} \geq R_{off} \end{cases} \quad (2.23)$$

Здесь R_{on} —заданный радиус действия ван-дер-ваальсовых сил, R_{off} —предел, за которым они уже не действуют. Функция переключения позволяет сократить количество вычисляемых невалентных взаимодействий: если в системе N атомов, то рассчитывать приходилось бы $\sim N^2$ невалентных взаимодействий, а их «обрезание» функцией переключения позволяет снизить число расчетов до $\sim C \cdot N$, где C есть среднее число атомов, попадающее в радиус взаимодействия R_{on} . Электростатические взаимодействия описываются потенциалом

$$U_{VdW} = \sum_{i < j} \sum_j \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}} W_{qq}(r_{ij}) \quad (2.24)$$

где q_i, q_j —парциальные заряды на атомах, ε —диэлектрическая проницаемость среды, а $W_{qq}(r_{ij})$ является функцией переключения вида

$$W_{qq}(r_{ij}) = \begin{cases} \left(1 - \frac{r_{ij}}{R_q}\right)^2 & r_{ij} < R_q \\ 0, & r_{ij} \geq R_q \end{cases} \quad (2.25)$$

R_q —радиус действия кулоновых сил.

Мощность современных вычислительных машин ограничивает явный расчет молекулярной динамики конденсированных сред (биомолекула в растворе) системами с линейными размерами не более десятка нанометров. При этом возникает проблема границ моделируемой системы: при таких размерах и объемах значительная часть атомов находится на границе конденсированной среды и вакуума, что сильно искажает её поведение. Способом исправить ситуацию является введение периодических граничных условий. При их введении предполагается, что за гранями расчетной ячейки находятся точно такие же ячейки, в которых происходит то же, что и в расчетной. Тогда если в процессе расчета некоторая частица покидает расчетную ячейку через одну из её граней, то соответствующая ей частица из соседней ячейки влетает в расчетную ячейку через противоположную грань (на самом деле, это та же частица). Предполагается также, что по каждому измерению присутствует сколько угодно много таких мнимых ячеек, так что краевых эффектов нет.

Введение периодических граничных условий в сочетании возможным присутствием сильных зарядов в моделируемой системе требует учитывать так называемые дальнедействующие электростатические взаимодействия — взаимодействия системы с её периодическими образами. Прямое суммирование вкладов приводит к медленно сходящейся сумме, вычисление которой поэтому крайне ресурсоемко. Выходом служит суммирование по Эвальду [102], суть которого в следующем. Совокупность точечных зарядов в системе и всех её периодических образах представляют как сумму экранированных непрерывно распределенной плотностью заряда противоположного знака точечных зарядов и компенсирующей экранирование плотности заряда (то есть, имеющей противоположный относительно экранирования знак), которые, как и точечные заряды, периодичны. Этот прием позволяет представить энергию электростатических взаимодействий как сумму двух величин: энергии взаимодействия точечных зарядов, обрезаемого на небольшом расстоянии в силу экранирования, которая быстро сходится из-за того, что рассчитывается только для моделируемой ячейки, и энергии дальнедействующих электростатических сил, вычисляемой при помощи дискретного преобразования Фурье периодической компенсирующей плотности заряда. Последняя величина также сходится быстро, поскольку она рассчитывается тоже только по моделируемой ячейке. Дальнейшим развитием этого подхода, позволяющим вычислять энергию электростатических взаимодействий ещё быстрее, стал метод сети частиц Эвальда [103; 104]: при расчете компенсирующей

плотности заряда реальные точечные заряды подменяются «частицами Эвальда» — виртуальными зарядами, расставленными по трехмерной сетке, накинута на моделируемую ячейку. Величины этих виртуальных зарядов получают интерполяцией реальных зарядов В-сплайнами, а получаемую при этом компенсирующую плотность также подвергают быстрому преобразованию Фурье и проделывают все те же действия, что и для суммирования по Эвальду.

Молекулярная система характеризуется температурой и давлением. Как их рассчитать для малой молекулярной системы? Обратимся к теореме о равнораспределении: если E —полная энергия системы, то

$$\left\langle p_k \frac{\partial E}{\partial p_k} \right\rangle = k_B T, \quad \left\langle q_k \frac{\partial E}{\partial q_k} \right\rangle = k_B T \quad (2.26)$$

где p_k, q_k — k -е обобщенные импульс и координата. При переходе к декартовым координатам равенства (2.36) принимают вид

$$\frac{1}{3} \left\langle \mathbf{p}_i \frac{\partial E}{\partial \mathbf{p}_i} \right\rangle = k_B T, \quad \frac{1}{3} \left\langle \mathbf{r}_i \frac{\partial E}{\partial \mathbf{r}_i} \right\rangle = k_B T \quad (2.27)$$

Расчет температуры исходит из первого равенства (2.36). Частная производная полной энергии по импульсу есть соответствующая скорость, то есть усредняемый член равен удвоенной компоненте кинетической энергии по данной обобщенной координате:

$$\left\langle p_k \frac{\partial E}{\partial p_k} \right\rangle = \langle p_k \dot{q}_k \rangle = \langle 2K_k \rangle = k_B T \quad (2.28)$$

Предполагается, что обобщенные координаты выбраны так, что движение центра масс системы уже отделено. Тогда, если в системе N молекул, то она имеет $s = 3N - 6$ внутренних степеней свободы. Суммируя по внутренним степеням свободы, которым соответствуют компоненты кинетической энергии, получаем:

$$\left\langle \sum_{k=1}^s K_k \right\rangle = \sum_{k=1}^s k_B T$$

$$\langle 2K_{int} \rangle = s k_B T$$

$$K_{int} = K - K_{trans} - K_{rot}$$

$$T = \frac{\langle 2K_{int} \rangle}{k_B s} \quad (2.29)$$

Предполагая, что моделируемая система совершает малые поступательные движения и вращения ($K_{trans}, K_{rot} \approx 0$), получаем $K_{int} \approx K$, и выражение для оценки температуры системы в процессе расчета:

$$T = \frac{\langle 2K \rangle}{k_B S} \quad (2.30)$$

$$\langle K \rangle = \frac{1}{t_{calc}} \int_0^{t_{calc}} K(t) dt \quad (2.31)$$

$$K(t) = \sum_{i=1}^N \frac{m_i \mathbf{v}_i^2(t)}{2} \quad (2.32)$$

Вводят также мгновенную температуру

$$T(t) = \frac{2K(t)}{k_B S} \quad (2.33)$$

В изолированной системе сохраняется полная энергия, но не кинетическая, следовательно, не сохраняется и температура. Температуру системы обычно поддерживают на одном уровне, предполагая, что система находится в термостате с температурой T_{ref} , задаваемой экспериментатором. Существует несколько алгоритмов термостатирования. Самым простым является термостат масштабирования скоростей. Принцип его действия в том, что вычисленные на каждом шаге скорости умножаются на фактор S

$$S = \sqrt{\frac{T_{ref}}{T(t)}} \quad (2.34)$$

что приравнивает мгновенную температуру к заданной. Заданная температура определяет скорости в начальный момент времени, генерируемые соответственно распределению Максвелла-Больцмана. Обычно операцию приведения скоростей в соответствие с заданной температурой — температурную привязку — проводят не на каждом шаге, а с периодом $\tau \geq \Delta t$ — периодом температурной привязки.

Термостат масштабирования скоростей имеет существенный недостаток — его применение приводит к перераспределению кинетической энергии от высокочастотных движений (колебания связей и валентных углов) к низкочастотным (перемещения молекул как целого), то есть нарушению равнораспределения энергии по степеням свободы [105]. Это явление называют «артефактом летающей льдинки» по очень яркому его проявлению: при расчете ячейки с горячим водяным паром через некоторое время пар превращается в кусочек льда, летающий по ячейке с бешеной

скоростью. Возникновение этого явления предупреждается использованием других алгоритмов термостатирования, например, алгоритма масштабирования скоростей с добавочным стохастическим членом, поддерживающим каноническое распределение скоростей [106]. На каждом шаге температурной привязки кинетическую энергию корректируют на величину

$$dK = (K_{ref} - K(t)) \frac{dt}{\tau} + 2\sqrt{\frac{K_{ref}K(t)}{s}} \frac{dW}{\sqrt{\tau}} \quad (2.35)$$

где dW — шум, случайная величина.

Как рассчитать давление? Обратимся ко второму равенству в (2.27). Частная производная полной энергии по координате есть производная импульса по времени, то есть сила

$$\frac{1}{3} \left\langle \mathbf{r}_i \frac{\partial E}{\partial \mathbf{r}_i} \right\rangle = \frac{1}{3} \langle -\mathbf{r}_i \dot{\mathbf{p}}_i \rangle = -\frac{1}{3} \langle \mathbf{F}_i \mathbf{r}_i \rangle = k_B T \quad (2.36)$$

Суммируем это равенство по всем частицам в системе, коих N

$$\frac{1}{3} \left\langle \sum_{i=1}^N \mathbf{F}_i \mathbf{r}_i \right\rangle = -Nk_B T \quad (2.37)$$

Усредняемая сумма скалярных произведений сил на радиус-векторы имеет размерность работы и может быть представлена в виде суммы двух средних: работы внешних сил и работы внутренних сил:

$$\left\langle \sum_{i=1}^N \mathbf{F}_i \mathbf{r}_i \right\rangle = \left\langle \sum_{i=1}^N \mathbf{F}_{i, \text{внешн}} \mathbf{r}_i \right\rangle + \left\langle \sum_{i=1}^N \mathbf{F}_{i, \text{внутр}} \mathbf{r}_i \right\rangle \quad (2.38)$$

Первый член суммы — работа внешних сил, которая (как известно из термодинамики) равна произведению давления на объем

$$\frac{1}{3} \left\langle \sum_{i=1}^N \mathbf{F}_{i, \text{внутр}} \mathbf{r}_i \right\rangle = -PV \quad (2.39)$$

Откуда получаем после перестановок членов выражение для давления:

$$Nk_B T = PV - \frac{1}{3} \left\langle \sum_{i=1}^N \mathbf{F}_{i, \text{внутр}} \mathbf{r}_i \right\rangle$$

$$P = \frac{Nk_B T}{V} + \frac{1}{3V} \left\langle \sum_{i=1}^N \mathbf{F}_{i, \text{внутр}} \mathbf{r}_i \right\rangle \quad (2.40)$$

Усреднение по работе внутренних сил называется внутренним вириалом:

$$\Xi = \frac{1}{3} \left\langle \sum_{i=1}^N \mathbf{F}_{i, \text{внутр}} \mathbf{r}_i \right\rangle = \frac{1}{6} \left\langle \sum_i \sum_{i \neq j} \mathbf{F}_{ij} \mathbf{r}_{ji} \right\rangle = \frac{1}{3} \left\langle \sum_i \sum_{i < j} \mathbf{F}_{ij} \mathbf{r}_{ji} \right\rangle \quad (2.41)$$

где \mathbf{F}_{ij} —сила, действующая от i -ой частицы на j -ую,. Присовокупляя выражение для температуры (2.30), получим после преобразований [107]

$$P = \frac{1}{3V} (2 \langle K \rangle - \Xi) \quad (2.42)$$

Будем называть описанный в этом разделе процесс равновесной молекулярной динамикой, поскольку здесь не предполагается никаких вмешательств в развитие системы из начального состояния во времени. На неё действуют только её внутренние силы.

2.2.2 Избранные методы молекулярной динамики

К сегодняшнему дню разработано столь много методов и приемов молекулярной динамики, в том числе весьма изопрённых, что их полное упорядоченное изложение потребовало бы составления очень увесистого тома. Здесь я изложу лишь некоторые методы молекулярной динамики, касающиеся двух важных взаимосвязанных проблем — расширения исследуемой в вычислительном эксперименте области фазового пространства и оценки свободной энергии молекулярной системы.

Зачем вообще проводят расчеты молекулярной динамики? Обычно для того, чтобы исследовать множество возможных конформаций изучаемой системы, наблюдать разворачивание конформационных или фазовых переходов, процесс самосборки молекулярных комплексов и, в случае квантовой или смешанной молекулярной динамики, — химические реакции. Однако равновесная молекулярная динамика, описанная в 2.2.1, не благоприятствует этим процессам, и вот по какой причине. Рассмотрим энергию системы в исходном состоянии, отвечающему моменту $t = 0$:

$$E(0) = K(\mathbf{v}(0)) + U(\mathbf{r}(0)) \quad (2.43)$$

Согласно уравнению 2.14, система движется по градиенту потенциальной энергии, следовательно, в направлении одного из ближайших локальных минимумов. В момент

первой температурной привязки $t = \tau$, считая, что $E(\tau) = E(0)$ с точностью расчета:

$$E(\tau) = K(\mathbf{v}(\tau)) + U(\mathbf{r}(\tau)) \quad (2.44)$$

причем потенциальная энергия понизилась за счет перераспределения в кинетическую:

$$K(\mathbf{v}(\tau)) > K(\mathbf{v}(0)), \quad U(\mathbf{r}(\tau)) < U(\mathbf{r}(0)) \quad (2.45)$$

После температурной привязки

$$K_{\text{привязанная}}(\mathbf{v}(\tau)) = K(\mathbf{v}(0))$$

$$E_{\text{привязанная}}(\tau) < E(0), \quad U(\mathbf{r}(\tau)) < U(\mathbf{r}(0)) \quad (2.46)$$

Иными словами, исходное состояние системы содержит запас потенциальной энергии, который в ходе расчета перераспределяется в кинетическую энергию, избыток которой, в свою очередь, изымается при термостатировании; таким образом, полная энергия системы убывает за счет извлечения потенциальной энергии. На некотором шаге расчета система достигнет одного из ближайших локальных минимумов, так что дальнейшее извлечение потенциальной энергии становится невозможным. Избыток энергии, позволяющий преодолевать барьеры между соседними минимумами, обеспечивается лишь кинетической энергией и довольно невелик: например, при температуре 298,15К он составляет, согласно уравнению 2.28, $1,24 \frac{\text{кДж}}{\text{моль}}$ (для сравнения, энергия водородной связи в воде $\approx 21 \frac{\text{кДж}}{\text{моль}}$). Этого недостаточно для гарантированного преодоления большей части энергетических барьеров за технически доступную протяженность траектории, следовательно, решение перечисленных выше задач очень затруднено.

Кроме перечисленных ранее задач исследователю часто требуется оценить свободную энергию некоего состояния системы, часто — свободную энергию системы в зависимости от некоей обобщенной переменной (межатомного расстояния, торсионного угла и т.п.). Последнюю величину часто называют потенциалом средней силы (PMF). Расчет молекулярной динамики позволяет оценивать эти величины непосредственно, исходя из статистической физики:

$$F = -k_B T \ln Z \quad (2.47)$$

где Z есть статистическая сумма, а F — свободная энергия Гельмгольца [108]. Пусть состояние нашей системы из N атомов описывается вектором Γ , указывающим её положение в фазовом пространстве.

$$\Gamma = (\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N, \mathbf{v}_1, \dots, \mathbf{v}_N) = (\mathbf{r}, \mathbf{v}) \quad (2.48)$$

Предположим, у нас определена обобщённая переменная $\mathbf{X} = \mathbf{X}(\mathbf{r})^2$; выделим в ансамбле систем те, в которых она принимает некоторое значение $X = x$. Вероятность встретить такую систему в ансамбле равна^{3 4}

$$P(\mathbf{x}) = \int P(\Gamma) \delta(\mathbf{X} - \mathbf{x}) d\Gamma = \frac{1}{Z} \int \exp\left\{-\frac{E(\Gamma)}{k_B T}\right\} \delta(\mathbf{X} - \mathbf{x}) d\Gamma = \frac{Z(\mathbf{x})}{Z} \quad (2.50)$$

где $Z(\mathbf{x})$ — статистическая сумма для ансамбля систем, в которых $\mathbf{X} = \mathbf{x}$. После преобразований получаем, согласно 2.47

$$Z = \frac{Z(\mathbf{x})}{P(\mathbf{x})}$$

$$F = -k_B T \ln Z = -k_B T \ln Z(\mathbf{x}) + k_B T \ln P(\mathbf{x}) = F(\mathbf{x}) + k_B T \ln P(\mathbf{x})$$

$$F(\mathbf{x}) - F = -k_B T \ln P(\mathbf{x}) \quad (2.51)$$

Поскольку такие расчеты предпринимаются для сравнения различных состояний одной и той же системы, то величина F неважна и её можно принять равной нулю. Вероятность $P(x)$ оценивается как доля $N(x)$ состояний в траектории, в которых $X = x$ [111]. Итак, оценка $F(x)$ вычисляется как

$$\tilde{F}(\mathbf{x}) = -k_B T \ln N(\mathbf{x}) \quad (2.52)$$

²В общем случае это вектор из нескольких обобщенных переменных

³Здесь и далее в выражениях, обращающихся со статистическими суммами, используются интегралы ради совместимости с оригинальными статьями и учебными пособиями. Но во всех случаях интегралы можно заменить на суммы без влияния на конечный результат, например

$$Z(x) = \sum_{\mathbf{x}=\mathbf{x}} \exp\left\{-\frac{E(\Gamma)}{k_B T}\right\} \quad (2.49)$$

Такая запись используется, если учитывают квантовые свойства молекулярных систем, например, дискретность колебательных уровней и т.п. Кроме того, от неё проще перейти к практическому воплощению метода

⁴Замечу, что в работах [109; 110] в формулах для вероятности состояния в экспоненте указывают не полную энергию $E(\mathbf{r}, \mathbf{v})$ (или гамильтониан $H(p, q)$), а потенциальную $U(\mathbf{r})$, что является грубой ошибкой.

Но этот расчет встречается с той же проблемой — в равновесной молекулярной динамике система редко посещает области с высокой потенциальной энергией, так что состояния концентрируются вблизи локальных минимумов. Из-за этого сколько-нибудь достоверно оценить $N(\mathbf{x})$ для состояний вдали от локального минимума невозможно.

Для решения этих проблем был разработан ряд подходов, рассмотренных ниже.

2.2.2.1 Молекулярная динамика с обменом реплик

Метод молекулярной динамики с обменом реплик заключается в параллельном моделировании одной и той же системы при разных температурах с периодическим «обменом местами» систем с разной температурой с масштабированием скоростей для приведения системы к соответствующей температуре. Пусть рассчитывается M копий (реплик) моделируемой системы из N атомов, обозначаемых буквой i , каждая при своей температуре, обозначаемой буквой m . Температуры выбираются так, что $T_m \geq T_{m+1}$ и не повторяются. Между репликой системы и температурой существует взаимно однозначное соответствие ($i = i(m)$, $m = m(i)$). Пусть также каждое состояние системы описывается вектором $\mathbf{\Gamma} = (\Gamma_1^{[i(1)]}, \dots, \Gamma_M^{[i(M)]})$, где $\Gamma_m^{[i]} = (\mathbf{r}^{[i]}, \mathbf{v}^{[i]})_m$ — совокупности координат и скоростей каждой реплики. В каждой из реплик состояние $\Gamma_m^{[i]}$ входит в ансамбль с фактором Больцмана

$$W_B(\Gamma_m^{[i]}, T_m) = \exp \left\{ \frac{-E(\Gamma_m^{[i]})}{k_B T_m} \right\} \quad (2.53)$$

Реплики рассчитываются одновременно и не взаимодействуют друг с другом. Поэтому фактор Больцмана для состояния $\mathbf{\Gamma}$ в обобщенном ансамбле, объединяющем все рассчитываемые реплики, рассчитывается как произведение факторов Больцмана из каждой реплики:

$$W_{REMD}(\mathbf{\Gamma}) = \prod_m^M W_B(\Gamma_m^{[i]}, T_m) = \exp \left\{ \sum_m^M \frac{-E(\Gamma_m^{[i(m)]})}{k_B T_m} \right\} \quad (2.54)$$

Обмен репликами можно обозначить как

$$\mathbf{\Gamma} = (\dots, \Gamma_m^{[i]}, \dots, \Gamma_n^{[j]}, \dots) \rightarrow \mathbf{\Gamma}' = (\dots, \Gamma_m^{[j]}, \dots, \Gamma_n^{[i]}, \dots) \quad (2.55)$$

При перестановке происходит масштабирование скоростей, подобное тому, которое используется при термостатировании:

$$\begin{cases} \mathbf{v}^{[i]'} = \mathbf{v}^{[i]} \sqrt{\frac{T_n}{T_m}} \\ \mathbf{v}^{[j]'} = \mathbf{v}^{[j]} \sqrt{\frac{T_m}{T_n}} \end{cases} \quad (2.56)$$

Чтобы равновесность обобщенного ансамбля не нарушалась, факторы Больцмана $W_{REMD}(\Gamma)$ и вероятности переходов $w(\Gamma \rightarrow \Gamma')$ должны удовлетворять равенству

$$W_{REMD}(\Gamma) w(\Gamma \rightarrow \Gamma') = W_{REMD}(\Gamma') w(\Gamma' \rightarrow \Gamma) \quad (2.57)$$

Из которого, с учётом 2.54 и 2.44, следует

$$\frac{w(\Gamma \rightarrow \Gamma')}{w(\Gamma' \rightarrow \Gamma)} = \exp \left\{ \sum_m^M \frac{-E(\Gamma_m^{[i(m)]})}{k_B T_m} - \sum_m^M \frac{-E(\Gamma_m^{[i'(m)]})}{k_B T_m} \right\} = \exp(-\Delta) \quad (2.58)$$

$$\begin{aligned} \Delta = & \frac{E(\Gamma_m^{[i(m)]})}{k_B T_m} - \frac{E(\Gamma_m^{[i'(m)]})}{k_B T_n} + \frac{E(\Gamma_n^{[j(n)]})}{k_B T_n} - \frac{E(\Gamma_m^{[j'(m)]})}{k_B T_m} = \\ & \frac{K(\mathbf{v}_m^{[i(m)]}) + U(\mathbf{r}_m^{[i(m)]})}{k_B T_m} - \frac{K(\mathbf{v}_m^{[i'(m)]}) + U(\mathbf{r}_m^{[i'(m)]})}{k_B T_n} + \\ & \frac{K(\mathbf{v}_n^{[j(n)]}) + U(\mathbf{r}_n^{[j(n)]})}{k_B T_n} - \frac{K(\mathbf{v}_m^{[j'(m)]}) + U(\mathbf{r}_m^{[j'(m)]})}{k_B T_m} \end{aligned} \quad (2.59)$$

Поскольку при обмене реплик масштабируются скорости, а координаты системы не меняются, то не меняются и потенциальные энергии

$$\left. \begin{aligned} \Gamma_m^{[i]} = (\mathbf{r}^{[i]}, \mathbf{v}^{[i]})_m \rightarrow \Gamma_m^{[i']} = (\mathbf{r}^{[i]}, \mathbf{v}^{[i']})_m \\ \Gamma_n^{[j]} = (\mathbf{r}^{[j]}, \mathbf{v}^{[j]})_n \rightarrow \Gamma_n^{[j']} = (\mathbf{r}^{[j]}, \mathbf{v}^{[j']})_n \end{aligned} \right\} \implies \begin{cases} U(\mathbf{r}_n^{[i(n)]}) = U(\mathbf{r}_n^{[i'(n)]}) \\ U(\mathbf{r}_n^{[j(n)]}) = U(\mathbf{r}_n^{[j'(n)]}) \end{cases} \quad (2.60)$$

В результате громоздких преобразований кинетические энергии устраняются, так что

$$\Delta = \left(\frac{1}{k_B T_n} - \frac{1}{k_B T_m} \right) (U(\mathbf{r}^{[i(m)]}) - U(\mathbf{r}^{[j(n)]})) \quad (2.61)$$

Условию 2.58 удовлетворяет критерий Метрополиса:

$$w(\Gamma \rightarrow \Gamma') = w(\Gamma_m^{[i(m)]} | \Gamma_n^{[j(n)]}) = \begin{cases} 1, & \Delta \leq 0 \\ e^{-\Delta}, & \Delta > 0 \end{cases} \quad (2.62)$$

Смысл периодического масштабирования температур в том, что система с большей температурой может находиться «над» потенциальными ямами благодаря большей кинетической энергии и блуждать между ними и, при масштабировании скоростей к меньшей температуре, «упасть» в одну из них. Система же с меньшей температурой при масштабировании скоростей к большей температуре, наоборот, может выйти из своей потенциальной ямы. За счет этого молекулярная динамика с обменом реплик позволяет получить более широкое множество возможных конформаций моделируемой системы [112]. Это, в свою очередь, упрощает расчет потенциала средней силы по формуле 2.63, поскольку становится возможна достоверная оценка $N(x)$ в более широкой области значений обобщенной переменной. Техническая реализация метода предполагает запись получаемых состояний по отдельности для каждой реплики, что делает возможным получение температурной зависимости потенциала средней силы:

$$\tilde{F}(x, T) = -k_B T \ln N(x, T) \quad (2.63)$$

Достоинство этого метода ещё и в том, что при расчете не требуется в явном виде определять обобщенные переменные, зависимость от которых потенциала средней силы предполагается найти. Благодаря этому оказывается возможен поиск глобального минимума в пространстве большой размерности. Ценой этого являются большие затраты вычислительных ресурсов.

2.2.2.2 Метод зонтичной выборки

Метод зонтичной выборки (Umbrella sampling) заключается в добавлении к энергии системы потенциала, зависящего от заданной обобщенной переменной $\mathbf{X}(\mathbf{r})$, который бы компенсировал потенциальную энергию так, чтобы состояния с более высокой энергией встречались чаще. Формально это выражается так:

$$E_{\text{взвеш}}(\Gamma) = E(\Gamma) + V(\mathbf{X})$$

$$U_{\text{взвеш}}(\mathbf{r}) = U(\mathbf{r}) + V(\mathbf{X}(\mathbf{r})) \quad (2.64)$$

где $V(\mathbf{X})$ называется взвешивающим потенциалом. Ансамбль с энергией $E_{\text{взвеш}}(\Gamma)$ будем называть взвешенным; для его состояний с определенным значением $\mathbf{X} = \mathbf{x}$ можно выразить вероятности аналогично уравнению 2.50

$$P_{\text{взвеш}}(\mathbf{x}) = \frac{\int \exp\left\{-\frac{E(\Gamma) + V(\mathbf{X})}{k_B T}\right\} \delta(\mathbf{X} - \mathbf{x}) d\Gamma}{\int \exp\left\{-\frac{E(\Gamma) + V(\mathbf{X})}{k_B T}\right\} d\Gamma} \quad (2.65)$$

В числителе интегрирование идет по состояниям с одним и тем же значением \mathbf{X} , следовательно, взвешивающий потенциал для них одинаков. Поэтому его можно вынести за интеграл:

$$P_{\text{взвеш}}(\mathbf{x}) = \exp\left(-\frac{V(\mathbf{X})}{k_B T}\right) \frac{\int \exp\left\{-\frac{E(\Gamma)}{k_B T}\right\} \delta(\mathbf{X} - \mathbf{x}) d\Gamma}{\int \exp\left\{-\frac{E(\Gamma) + V(\mathbf{X})}{k_B T}\right\} d\Gamma} \quad (2.66)$$

Снова обращаясь к уравнению 2.50, получим

$$\int \exp\left\{-\frac{E(\Gamma)}{k_B T}\right\} \delta(\mathbf{X} - \mathbf{x}) d\Gamma = P(\mathbf{x}) Z = P(\mathbf{x}) \int \exp\left\{-\frac{E(\Gamma)}{k_B T}\right\} d\Gamma \quad (2.67)$$

Подставляем в 2.66

$$P_{\text{взвеш}}(\mathbf{x}) = P(\mathbf{x}) \exp\left(-\frac{V(\mathbf{X})}{k_B T}\right) \frac{\int \exp\left\{-\frac{E(\Gamma)}{k_B T}\right\} d\Gamma}{\int \exp\left\{-\frac{E(\Gamma) + V(\mathbf{X})}{k_B T}\right\} d\Gamma} \quad (2.68)$$

Откуда имеем

$$P(\mathbf{x}) = P_{\text{взвеш}}(\mathbf{x}) \exp\left(\frac{V(\mathbf{X})}{k_B T}\right) \frac{\int \exp\left\{-\frac{E(\Gamma) + V(\mathbf{X})}{k_B T}\right\} d\Gamma}{\int \exp\left\{-\frac{E(\Gamma)}{k_B T}\right\} d\Gamma}$$

$$P(\mathbf{x}) = P_{\text{взвеш}}(\mathbf{x}) \exp\left(\frac{V(\mathbf{X})}{k_B T}\right) \frac{\int \exp\left\{-\frac{E(\Gamma)}{k_B T}\right\} \exp\left\{-\frac{V(\mathbf{X})}{k_B T}\right\} d\Gamma}{\int \exp\left\{-\frac{E(\Gamma)}{k_B T}\right\} d\Gamma} = \quad (2.69)$$

$$P_{\text{взвеш}}(\mathbf{x}) \exp\left(\frac{V(\mathbf{X})}{k_B T}\right) \left\langle \exp\left\{-\frac{V(\mathbf{X})}{k_B T}\right\} \right\rangle$$

Подставим результат в 2.63, предполагая оценкой $P_{\text{взвеш}}(\mathbf{x})$ величину $N_{\text{взвеш}}(\mathbf{x})$

$$\tilde{F}(\mathbf{x}) = -k_B T \ln N_{\text{взвеш}}(\mathbf{x}) - V(\mathbf{X}) + A \quad (2.70)$$

$$A = -k_B T \ln \left\langle \exp\left\{-\frac{V(\mathbf{X})}{k_B T}\right\} \right\rangle \quad (2.71)$$

Величина A не зависит от обобщенной переменной \mathbf{X} . Если взвешивающий потенциал определен так, чтобы выровнять вероятности состояний системы со всеми интересующими значениями обобщенной переменной, то уравнения 2.70 достаточно, чтобы оценить потенциал средней силы. При этом A можно выбрать произвольно, например, принять его равным нулю. Однако если приходится изучать ландшафт свободной энергии, задавая разные взвешивающие потенциалы $V_i(\mathbf{X})$ в разных областях значений \mathbf{X} , называемых окнами,⁵ то для каждого окна придется выполнить отдельный расчет. В этом случае значение A_i для i -го окна придется считать. Из 2.71 следует, что

$$\exp\left\{-\frac{A_i}{k_B T}\right\} = \left\langle \exp\left\{-\frac{V(\mathbf{X})}{k_B T}\right\} \right\rangle \quad (2.72)$$

$$= \int P(\mathbf{X}) \exp\left\{-\frac{V(\mathbf{X})}{k_B T}\right\} d\mathbf{X} = \int \exp\left\{-\frac{F(\mathbf{X}) + V(\mathbf{X})}{k_B T}\right\} d\mathbf{X}$$

Поскольку A_i и $F(\mathbf{X})$ взаимозависимы, получить A_i из траектории напрямую нельзя [113]. Впрочем, существуют методы объединения результатов расчетов разных окон воедино. Одним из них является метод анализа взвешенных гистограмм (WHAM) [114; 115], состоящий в последовательном приближении набора A_i с целью минимизировать статистическую ошибку объединенного распределения вероятностей

⁵ Например, если изучается изменение свободной энергии в ходе конформационного перехода, то можно задать некую переменную, равную нулю в исходном состоянии и единице — в конечном. Она будет задавать расстояние, пройденное системой вдоль пути между начальным и конечным состояниями, изображаемым некой кривой. Тогда можно разбить путь на N равных отрезков — окон, определив на каждом свой $V_i(\mathbf{X})$. Для каждого окна можно получить отдельную траекторию

состояний $P(\mathbf{X})$. Объединенное распределение есть взвешенная сумма распределений, полученных для каждого окна:

$$P(\mathbf{X}) = \sum_i w_i(\mathbf{X}) P_i(\mathbf{X}) \quad (2.73)$$

Веса $w_i(\mathbf{X})$ для каждого значения обобщенной переменной выбираются так, чтобы минимизировать статистическую ошибку объединенного распределения при условии, что сумма весов равна единице

$$\frac{\partial \sigma^2(P)}{\partial w_i} = 0, \quad \sum_i w_i(\mathbf{X}) = 1 \quad (2.74)$$

Опустим долгие выкладки, перейдя сразу к результату, следующему из этих условий.

Веса вычисляются так

$$w_i(\mathbf{X}) = \frac{\alpha_i}{\sum_j \alpha_j}, \quad \alpha_i(\mathbf{X}) = N_i \exp \left\{ -\frac{V_i(\mathbf{X}) - A_i(\mathbf{X})}{k_B T} \right\} \quad (2.75)$$

где N_i — общее количество кадров в траекториях, полученных для i -го окна. A_i получаются по формуле 2.72. В целом, алгоритм анализа взвешенных гистограмм таков:

1. Задать набор начальных приближений $\{A_i^k\}$, $k = 0$
2. По формулам 2.75 вычислить веса $\{w_i^k\}$
3. По формуле 2.73 вычислить приближение объединенного распределения $P^k(\mathbf{X})$
4. По формуле 2.72 вычислить $\{A_i^{k+1}\}$
5. Если $P^k(\mathbf{X})$ не сошлось, перейти с $\{A_i^{k+1}\}$ к шагу 2

Метод зонтичной выборки, при всех своих достоинствах, несет в себе проблему: успешный обход системой интересующей исследователя области значений обобщенной координаты \mathbf{X} предполагает удачный выбор взвешивающего потенциала $V(\mathbf{X})$ до расчета. Очевидно, что наиболее удачным выбором был бы взвешивающий потенциал, компенсирующий потенциал средней силы:

$$V(\mathbf{X}) = -F(\mathbf{X}) \quad (2.76)$$

В этом случае во взвешенном ансамбле $P_{\text{взвеш}}(\mathbf{X})$ были бы равны для любого значения \mathbf{X} . Но знать форму потенциала средней силы наперед едва ли возможно.

2.2.2.3 Метадинамика

Метадинамику можно рассматривать как развитие метода зонтичной выборки, в котором взвешивающий потенциал не постоянен, а изменяется со временем, подстраиваясь под выясняемый ландшафт свободной энергии [116; 117]. Пусть обобщенная переменная \mathbf{X} есть K -мерный вектор

$$\mathbf{X}(\mathbf{r}) = (x_1(\mathbf{r}), \dots, x_K(\mathbf{r})) \quad (2.77)$$

Взвешивающий потенциал принято задавать в виде суммы K -мерных гауссовых функций, добавляемых с определенной периодичностью

$$V(\mathbf{X}) = V(\mathbf{X}, t) = W \sum_{\substack{i \\ i\tau_G < t}} \exp \left\{ - \sum_j^K \frac{(x_j(\mathbf{r}) - x_j(i\tau_G))^2}{2\sigma_j^2} \right\} \quad (2.78)$$

где

- $x_j(i\tau_G) = x_j(\mathbf{r}(i\tau_G))$ — значение j -ой компоненты \mathbf{X} в момент времени $t = i\tau_G$;
- τ_G — период, с которым к взвешивающему потенциалу прибавляется новая гауссова функция;
- W — высота прибавляемых гауссовых функций;
- σ_j — ширина гауссовой функции по j -ой компоненте \mathbf{X} .

Как указывалось в начале 2.2.2, моделируемая система довольно быстро упадет в ближайший локальный минимум свободной энергии и будет блуждать в нём. Это утверждение верно и для взвешенного $V(\mathbf{X}, t)$ ансамбля — к концу очередного периода τ_G система упадет в минимум частично скомпенсированной свободной энергии (то есть, в наименее скомпенсированную часть её рельефа). Следовательно, значения \mathbf{X} будут концентрироваться вблизи некоего \mathbf{x} , соответствующего дну этого минимума. Добавление к взвешивающему потенциалу гауссовых функций с центром вблизи \mathbf{x} будет делать этот локальный минимум все менее и менее глубоким, так что однажды кинетической энергии системы достанет, чтобы перекатиться через самую низкую

седловую точку в соседний минимум, где повторится тот же процесс изглаживания рельефа поверхности свободной энергии.⁶ В пределе свободная энергия будет полностью скомпенсирована и распределение вероятностей $P(\mathbf{X})$ станет плоским. Поэтому можно сказать, что

$$V(\mathbf{X}, t) \rightarrow -F(\mathbf{X}) \quad (2.79)$$

Алгоритм метадинамики можно кратко описать так:

1. Задать начальный вид взвешивающего потенциала $V(\mathbf{X}, 0)$
2. С $(i - 1)\tau_G$ по $i\tau_G$ получить некоторое количество состояний системы
3. Добавить гауссову кривую с центром в $\mathbf{X}(\mathbf{r}(i\tau_G))$
4. Перейти к шагу 2

Этих мер достаточно, чтобы побудить систему покинуть тот локальный энергетический минимум, вблизи от которого она находилась в начале расчета и перейти в соседние. Кроме того, они позволяют оценить $\langle \mathbf{X} \rangle$ по формуле 2.76. Но эта оценка будет иметь точность порядка высоты добавленных гауссовых функций W . Чем она меньше, тем выше точность, но меньше скорость изглаживания рельефа свободной энергии. Но минимум, который требуется покинуть, может быть довольно глубок, так что W нужно будет задать большим, чтобы достичь результата за технически доступное время расчета. Кроме того, описанное воплощение метадинамики не предполагает ограничения исследуемой области фазового пространства по величине преодолеваемых системой энергетических барьеров, что может быть существенно, поскольку при длительном изглаживании система может добраться до «нефизичных» областей фазового пространства. Эти проблемы решаются применением

⁶ Прибегнем к метафоре, чтобы сделать изложение более понятным. Представим себе, что поверхность свободной энергии — горная местность с труднодоступными вершинами и множеством долин (энергетические минимумы), соединенных перевалами. В одной из долин есть озеро (величина кинетической энергии), по которому плавает в лодке рыбак. Ему для свободного перемещения доступна лишь небольшая площадь долины в самом её низу, а переплыть в соседнюю долину он вообще не в состоянии. Но если в долине пойдет сильный дождь (добавление гауссовых функций к взвешивающему потенциалу, исходно нулевому), то уровень воды в озере будет повышаться, а с этим будет увеличиваться и зеркало озера. Рыбаку же будет доступна все большая и большая площадь для свободного плавания. Однажды вода дойдет до самого низкого перевала, так что рыбак сможет доплыть до него даже случайно и перетащить лодку в соседнюю долину. Вслед за ним перейдет и дождевая туча, так же наполняящая водой (взвешивающим потенциалом) и эту долину. Однажды уровень воды станет таков, что и первая, и вторая долина уйдут под воду, так что рыбак сможет свободно переплывать туда и обратно. Если дождь не остановится, уровень дойдет до перевала, ведущего в ещё одну долину, и так далее.

уравновешенной метадинамики [118], в которой высота добавляемой гауссовой кривой меняется в зависимости от величины взвешивающего потенциала: чем больше значение взвешивающего потенциала в точке \mathbf{X} , тем меньше высота добавляемой в этой точке гауссианы. Проще всего этого добиться, если высота гауссианы пропорциональна экспоненте от взвешивающего потенциала, взятого с отрицательным знаком:

$$W = W(\mathbf{X}, t) = w \exp \left\{ -\frac{V(\mathbf{X}, t)}{k_B \Delta T} \right\} \quad (2.80)$$

Так что уравнение 2.78 принимает вид

$$V(\mathbf{X}, t) = \sum_{\substack{i \\ i\tau_G < t}} w \exp \left\{ -\frac{V(\mathbf{X}, i\tau_G)}{k_B \Delta T} \right\} \exp \left\{ -\sum_j^K \frac{(x_j(\mathbf{r}) - x_j(i\tau_G))^2}{2\sigma_j^2} \right\} \quad (2.81)$$

Здесь величина w — высота гауссовой кривой при $t = 0$, а ΔT — подобие характеристической температуры, величина, задающая скорость, с которой уменьшается высота гауссовых кривых. Рассмотрим два случая:

$$\begin{cases} \Delta T \rightarrow \infty \implies W(\mathbf{X}, t) \rightarrow w \\ \Delta T \rightarrow 0 \implies W(\mathbf{X}, t) \rightarrow 0 \end{cases} \quad (2.82)$$

В первом случае высота гауссовых функций становится постоянной и все возвращается к обычной метадинамике, во втором высота гауссовых функций устремляется к нулю, что отвечает моделированию невзвешенного ансамбля. Очевидно, что на больших промежутках времени $W(\mathbf{X}, t)$ в точках с большим значением взвешивающего потенциала устремится к нулю, так что изменение формы взвешивающего потенциала почти прекратится: даже если гауссиана большой высоты будет добавлена в точку, где значение взвешивающего потенциала мало, то система соскользнет с неё в области с меньшим значением суммы $F(\mathbf{X}) + V(\mathbf{X})$ (то есть в область минимума свободной энергии невзвешенного ансамбля), где рост взвешивающего потенциала будет мал⁷. Оценка свободной энергии для уравновешенной метадинамики имеет вид

$$F(\mathbf{X}) = -\frac{T + \Delta T}{\Delta T} V(\mathbf{X}) \quad (2.83)$$

⁷ В выражениях метафоры про горы, рыбака и дождь последний стихает, когда вода в долине дойдет до определенного уровня.

2.2.2.4 Управляемая динамика

Управляемая динамика относится к группе так называемых неравновесных методов и заключается в принудительном проведении системы по заданным значениям выбранной обобщенной переменной. Метод основан на применении равенства Ярынского [119]

$$\left\langle \exp \left\{ -\frac{W}{k_B T} \right\} \right\rangle = \exp \left\{ -\frac{\Delta F_{1 \rightarrow 2}}{k_B T} \right\} \quad (2.84)$$

где W — работа, совершенная над системой для перевода её из состояния 1 в состояние 2, разница в свободной энергии Гельмгольца между которыми составляет $\Delta F_{1 \rightarrow 2}$. Усреднение в левой части равенства производится по множеству траекторий, в которых над системой совершалась работа. Существуют два основных подхода: приложение к системе постоянной силы и продвижение системы с постоянной скоростью [120]. Рассмотрим последний подход как более употребительный; для простоты будем рассматривать одномерный случай. Пусть введена обобщенная переменная x . Система будет моделироваться с видоизмененным гамильтонианом, содержащим дополнительный член, зависящий от времени:

$$H_\lambda(t) = H + V_\lambda(t) \quad (2.85)$$

в котором H есть гамильтониан системы, а $V_\lambda(t)$ — некий потенциал, зависящий от времени и привязывающий систему к виртуальному «зонду», за который перемещают систему. Проще всего задать его как параболический потенциал

$$V_\lambda(t) = \frac{k}{2} (x - \lambda(t))^2 \quad (2.86)$$

$\lambda(t)$ изменяется задаваемым экспериментатором образом, заставляя систему менять x вслед за собой. Если $\lambda(t)$ меняется с постоянной скоростью, то уравнение 2.86 имеет вид

$$V_\lambda(t) = \frac{k}{2} (x - x_0 - vt)^2 \quad (2.87)$$

Можно считать, что при совершении работы над системой ей передается энергия. Пусть за единицу времени системе передается работа dW , которая равна изменению полной энергии dH_λ . Тогда можно записать

$$\frac{dW}{dt} = \frac{dH_\lambda(t)}{dt} = \frac{\partial H_\lambda(t)}{\partial t} \quad (2.88)$$

Учитывая 2.85, 2.86 и 2.87, получим

$$\frac{\partial H_\lambda(t)}{\partial t} = \frac{\partial V_\lambda(t)}{\partial t} = -k(x - \lambda(t)) \frac{\partial \lambda(t)}{\partial t} = -vk(x - \lambda(t)) \quad (2.89)$$

Полная работа, совершенная над системой за время t есть интеграл мощности по времени

$$W = \int_0^t dW = \int_0^t \frac{\partial H_\lambda(t')}{\partial t'} dt' = \int_0^t -k(x - \lambda(t')) \frac{\partial \lambda(t')}{\partial t'} dt' = \int_0^t -vk(x - x_0 - vt') dt' \quad (2.90)$$

Иными словами, при моделировании определяется обобщенная переменная x , скорость её изменения v и задается начальное значение x_0 . Затем с определенным шагом Δt меняется значение $\lambda(t) = x_0 + vt$ и вычисляется работа над системой за Δt с использованием формулы 2.89. Эти величины сохраняются и после моделирования суммируются, давая работу над системой W . Такое моделирование повторяется нужное количество раз, чтобы произвести усреднение и получить оценку изменения свободной энергии по формуле 2.84 [121].

Очевидно, что кроме оценки свободной энергии метод управляемой динамики может использоваться для проведения системы через редко посещаемые области фазового пространства. Например, можно вынудить систему совершить конформационный переход и т.п. Недостатком этого метода как средства оценки потенциала средней силы нужно считать его сильную зависимость от параметров продвижения. В пределе скорость продвижения системы должна быть бесконечно малой, что соответствует бесконечно большому времени протекания процессов, обеспечивающему их равновесность; тогда полученная в этом гипотетическом моделировании работа и будет равна изменению свободной энергии. Чем выше скорость продвижения, тем чаще система будет проходить по неоптимальному пути и тем более неточной будет оценка.

2.3 Исследование рибосомы методом молекулярной динамики

Метод молекулярной динамики стал достаточно широко применяться в исследованиях рибосомы сравнительно недавно. Однако уже сейчас можно выделить

три основных направления таких исследований: моделирование динамики работы рибосомы как молекулярной машины, физико-химическое изучение рибосомного туннеля и изучение молекулярных механизмов связывания лигандов рибосомы. В свою очередь, работы, посвященные изучению динамики рибосомы как молекулярной машины, можно сгруппировать по изучаемым процессам.

2.3.1 Моделирование рибосомы как молекулярной машины

Работы этого направления посвящены, в основном, моделированию распознавания рибосомой аминоксил-тРНК, моделированию динамики пептидилтрансферазного центра и моделированию процесса транслокации. Кроме того, отдельно следует рассмотреть работы, посвященные построению т.н. крупнозернистых моделей рибосомы.

2.3.1.1 Моделирование распознавания тРНК

Как уже отмечалось выше, процесс распознавания тРНК комплексом рибосомы с мРНК носит отчетливо выраженный динамический характер. Поэтому неудивительно, что он привлек к себе внимание исследователей, применяющих моделирование молекулярной динамики.

В интересной работе Сатпати и Аквиста [122] рассматривается вопрос о том, почему таутомеризация азотистых оснований из кето- в енольную форму не вызывает ошибок при декодировании мРНК. Дело в том, что енольная форма гуанозина становится более похожей на аденозин, енольная форма уридина — на цитидин, имино-форма аденозина — на гуанозин, а имино-форма цитидина — на уридин, что позволяет енольным и имино-формам нуклеотидов образовывать неканонические пары, геометрически похожие на канонические. Это должно быть источником ошибок при взаимном распознавании кодона и антикодона. Методом возмущения свободной энергии (FER) [123] в 51 окне авторы рассчитывали свободные энергии связывания тРНК^{Phe}, несущих правильные антикодоны, антикодоны с заменой А на G в первом (тРНК^{Leu}) или втором (тРНК^{Ser}) положениях антикодона и антикодоны с заменой А на енольный таутомер G, с мРНК, несущей UUU-кодон, обычный или с енольным таутомером остатка уридиловой кислоты по первому или второму положениям (только для антикодонов с кето-формой гуанозина), которые сравнивали друг с другом. Выяснилось, что замена А на кето-форму G в первой позиции дает потерю в

свободной энергии связывания Гиббса примерно на 5 ккал/моль, а замена на енольную форму G дает почти ту же потерю (1 ккал/моль при погрешности в 1 ккал/моль). Однако такая же замена во второй позиции для енольной формы гуанозина более выгодна, так как уменьшает потерю в энергии связывания (12,8 ккал/моль) на 4 ккал/моль. Впрочем, вероятность связывания антикодонов с енольной формой гуанозина в первой или второй позиции все равно не менее чем в 10^4 раз меньше, чем для правильного антикодона. Переход остатка уридиловой кислоты в первой и, тем более, второй позиции кодона из кето-в енольную форму приводит к ещё большей потере в величине энергии связывания. Следует заметить, однако, что рассмотренные выше расчеты носят несколько умозрительный характер, так как существование азотистых оснований РНК в енольной или имино-формах в условиях функционирования рибосомы маловероятно, хотя с методической точки зрения эта работа безусловно интересна.

Те же авторы нашли ответ на вопрос, имеющий непосредственное отношение к реальности, а именно: как модификации в тРНК помогают ей отличать AUA-кодон (изолейцин) от AUG-кодона (метионин) [124]. Дело в том, что в бактериях и археях одна из тРНК^{Ile} несет антикодон CAU, который должен был бы распознаваться метиониновым кодоном, если бы не модификации остатка C34 в тРНК^{Ile} (третья позиция антикодона) по положению C² лизидином у бактерий или агматидином у архей. Используя метод возмущения свободной энергии, авторы установили, что при замене кодона AUA на AUG в мРНК немодифицированный C34 обеспечивает прирост в свободной энергии связывания тРНК в 3 ккал/моль, тогда как C34, модифицированный агматидином, дает потерю свободной энергии связывания в 7 ккал/моль. При этом эта потеря почти одинакова и для amino-, и для имино-формы модифицированного цитидина. Таким образом, связывание тРНК^{Ile} с модифицированным агматидином C34 в антикодоне CAU с метиониновым кодоном AUG на 10 ккал/моль менее выгодно, чем тРНК^{Met}, что обеспечивает нужную селективность.

Другой важный аспект проблемы распознавания тРНК в процессе трансляции, а именно, роль остатков A1492 и A1493 16S рРНК 30S субъединицы в стабилизации связывания «правильной» тРНК с рибосомой был рассмотрен в работе Брукса и сотрудников [125]. Используя метод зонтичной выборки и термодинамического интегрирования [126], исследователи вычислили, что само по себе выпетливание этих остатков из спирали требует затрат свободной энергии в

7 ккал/моль. Связывание «правильной» тРНК дает выигрыш свободной энергии в 9 ккал/моль, покрывая энергетические затраты на выщепливание и делая его самопроизвольным: энергетический эффект такого процесса -2 ккал/моль. Связывание же «неправильной» тРНК дает выигрыш свободной энергии только в 6 ккал/моль и не покрывает затраты на выщепливание A1492 и A1493. Кроме того, в этой работе ещё раз, уже методами молекулярной динамики, был подтвержден механизм действия аминогликозидного антибиотика паромомицина, который стабилизирует выщепленное состояние A1492 и A1493 и делает связывание и «правильной», и «неправильной» тРНК энергетически выгодным, хотя в последнем случае энергетический выигрыш всё же оказывается меньше.

В соответствии с общепринятыми представлениями (см., например, [127]) аминоацил-тРНК в комплексе с элонгационным фактором Tu и рибосомой находится в особой конформации, называемой А/Т-состоянием. В работе [128] методом молекулярной динамики с демоном Максвелла (MdMD) моделировалась аккомодация аминоацил-тРНК в А-сайт, то есть переход её из А/Т-в А/А-состояние. Метод молекулярной динамики с демоном Максвелла относится к семейству методов молекулярной динамики со взвешенным ансамблем и состоит в том, что расчет молекулярной динамики через разные промежутки времени прерывается с тем, чтобы проверить, убывала ли энтропия системы в только что полученном отрезке траектории. Если энтропия убывала, то координаты и скорости последнего полученного состояния запоминаются и расчет продолжается до следующей проверки. Если же энтропия росла, то расчет начинается вновь с предыдущего запомненного состояния. В целом, этот процесс на протяжении всего расчета ведет моделируемую систему через состояния с наибольшей свободной энергией, способствуя преодолению системой энергетических барьеров. При моделировании системы, состоящей из полностью сольватированной 70S рибосомы, несущей мРНК, А-тРНК в А/Т-состоянии, Р-тРНК и Е-тРНК авторы наблюдали особенности перехода А-тРНК из А/Т в А/А-состояние. В ходе этого процесса тРНК случайным образом блуждает из А/Т в А/А-состояние, что облегчается энергией, запасаемой в изогнутой конформации тРНК в А/А-состоянии. При этом 3'-конец аминоацил-тРНК преодолевает два пространственных барьера, первый из которых создается белком L14, и чтобы его преодолеть, основание A76 в тРНК должно отойти от основания C75, как бы отгибаясь в противоположную движению 3'-конца сторону, а второй — спиралью H71 и H92.

Ранее было обнаружено, что А-петля ПТЦ также препятствует связыванию

аминоацил-тРНК в А-сайте, затрудняя переход из А/Т в А/А-состояние [129].

2.3.1.2 Моделирование пептидилтрансферазного центра

Работы, посвященные изучению конформационной подвижности и функциональной роли консервативных нуклеотидных остатков пептидилтрансферазного центра (ПТЦ), как правило, представляют собой комплексные исследования, в которых метод молекулярной динамики сочетается с избирательной химической модификацией этих остатков или с их направленным мутагенезом. Так, Полачек и сотрудники [130] при помощи экспериментов по трансляции *in vitro*, осуществляемой рибосомами с нуклеотидными остатками в ПТЦ либо вовсе лишенными азотистых оснований, либо содержащими азотистое основание, лишенное той или иной функциональной группы, установили, что разрушение неканонической пары А2450-С2063 приводит к подавлению синтеза полифенилаланина. Для объяснения этого факта ими было применено молекулярно-динамическое моделирование ПТЦ, в котором эта неканоническая пара разрушалась заменой аденина А2450 на пурин или изъятием азотистых оснований из остатков А2450 или С2063. Анализ результатов моделирования показал, что разрушение неканонической пары А2450-С2063 любым способом приводило к радикальному снижению конформационной подвижности нуклеотидного остатка А2062, которая в нормальной рибосоме очень высока, и к нарушению его взаимодействий с аминокислотным остатком на 3'-конце А-тРНК, обусловленному тем, что остаток А2062 замирает в конформации, исключающей такое взаимодействие. С методической точки зрения работа служит примером моделирования лишь небольшой области рибосомы вместо моделирования целой рибосомы: моделировалась окрестность консервативных оснований радиусом в 3,2 нм, причем основания, лежащие за пределом 2 нм от центра моделируемой области, были фиксированы. Преимущество такого подхода заключается в экономии вычислительных ресурсов.

Известно, что мутация G2482A рибосомы *H. marismortui* (G2447A *E. coli*) вызывает устойчивость бактериальных рибосом к антибиотикам, например, к хлорамфениколу или тиамулину, связывающимся в «гидрофобном кармане» ПТЦ, образуемом остатками А2486 и С2487 (А2451 и С2452 *E. coli*). При этом остаток G2482 не контактирует с такими антибиотиками непосредственно. Моделируя методом молекулярной динамики рибосому *H. marismortui*, содержащую и не содержащую мутацию G2482A и анализируя полученные траектории методами анализа основных

компонент и кросс-корреляционного анализа, исследователи пришли к выводу о том, что возникновение устойчивости к антибиотикам связано с увеличением подвижности остатков A2486 и C2487 (A2451 и C2452 *E. coli*), которое вызвано возмущением сети нековалентных взаимодействий, удерживающих пространственную структуру 23S рРНК [131].

В работе Гонзалеса и сотрудников [132] молекулярную динамику использовали для моделирования структуры элонгационного комплекса, содержащего Р-тРНК, ацилированную D-аминокислотой. Моделирование показало, что аминогруппа L-аминокислоты на А-тРНК оказывается дальше от сложноэфирной группы D-аминокислотного остатка на 3'-конце Р-тРНК, чем от оной L-аминокислотного остатка; это обстоятельство затрудняет нуклеофильную атаку аминогруппой в ходе пептидилтрансферазной реакции, что и объясняет установленное в той же работе биохимическими методами радикальное затруднение трансляции с участием тРНК, несущих D-аминокислоту.

Работа [133] является примером того, как рибосому можно использовать в качестве объекта для разработки методов изучения согласованного движения остатков в биополимерах. Авторы этого исследования взяли 70S рибосому *T. thermophilus*, несущую или не несущую тРНК и мРНК; согласованность движения остатков искали, вычисляя взаимную информацию для расстояния между наличным положением атома и скользящим средним его координат и кластеризуя координаты методом K-средних. При этом было выяснено, что остатки А-сайта и Р-сайта 50S субъединицы движутся независимо друг от друга. Кроме того, остатки А-сайта, платформы, на которой связывается 30S субъединица и протуберанцев движутся независимо от остальной 50S субъединицы.

2.3.1.3 Моделирование транслокации

В ходе транслокации происходит строго координированное перемещение по поверхности рибосомы крупных лигандов — мРНК и тРНК. Поэтому моделирование этой стадии белкового синтеза методами молекулярной динамики представляет особый интерес. И здесь удалось получить несколько нетривиальных результатов. Так, в лаборатории Санбонматсу был разработан остроумный метод моделирования переходных состояний комплекса на примере т.н. гибридных комплексов рибосомы с тРНК [134]. Суть метода заключается в следующем. Авторы использовали

структуру комплекса бактериальной рибосомы с тРНК в Р/Р,А/А-состоянии и комплекса рибосомы с тРНК в Е/Е,Р/Р-состоянии и фактором EF-G, полученные методом рентгеноструктурного анализа. Эти структуры соответствуют основному состоянию комплексов, энергетическому минимуму. С другой стороны, метод криоэлектронной микроскопии с анализом отдельных изображений позволил получить карты электронной плотности для аналогов переходного состояния комплекса рибосомы с EF-G с тРНК в состоянии P/E^{pre} и P/E^{post} . В эту карту была вписана трехмерная структура комплекса рибосомы с тРНК и EF-G. Далее была проведена минимизация энергии комплекса рибосомы с тРНК в Р/Р,А/А-состоянии и EF-G с гамильтонианом вида

$$H = H^{SB} + H^{map} = H^{SB} + W \sum_{i,j,k} \rho_{ijk}^{sim} \rho_{ijk}^{exp} \quad (2.91)$$

где H^{SB} —гамильтониан, основанный на структуре моделируемого комплекса, а H^{map} —член, учитывающий электронные плотности. $\rho_{ijk}^{sim} \rho_{ijk}^{exp}$ —соответственно, рассчитанные и экспериментальные нормализованные электронные плотности в кубической области с номерами (i, j, k) (то есть на пространство, занимаемое моделируемой структурой, накинута трехмерная сетка, разбивающая его на небольшие кубические объемы, которые нумеруются тремя числами). Сумма их произведений задает энергию переходного состояния, которая выше энергии основного, но коэффициент W выбран так, чтобы член H^{map} задавал более глубокий энергетический минимум, чем H^{SB} . В результате, при минимизации энергии с таким гамильтонианом комплекс «соскальзывает» к структуре, соответствующей переходному состоянию. Этим способом были получены структуры рибосомы в гибридных А/Р*-Р/Е и А/Р-Р/Е-состояниях в присутствии фактора EF-G.

Переход деацилированной тРНК из Р-сайта в Е-сайт, точнее, из Р/Р в гибридное Р/Е-состояние, моделировался в работе [135]. Обобщая данные 120 траекторий, авторы установили, что образование гибридного состояния начинается с поворота малой субъединицы относительно большой на 5 градусов против часовой стрелки, что приводит к образованию растянутой конформации тРНК в Р/Р-состоянии. Запасенная в этой конформации энергия расходуется на следующих фазах перехода. Вслед за этим плечо тРНК продвигается к конфигурации, соответствующей гибриднему состоянию, не встречая стерических затруднений, и лишь затем 3'-ССА-конец тРНК покидает Р-сайт большой субъединицы и входит в Е-сайт,

взаимодействуя с остатками спирали 74 23S рРНК по ходу перемещения. Стоит обратить внимание на использованные методы моделирования. Для моделирования перехода использовалась т.н. направленная динамика, являющаяся разновидностью управляемой динамики (см. 2.2.2.4), в которой обобщенная координата отображает удаленность уже существующей конформации моделируемой системы от той, к которой нужно прийти, так что смещающий потенциал тянет систему к заданной конформации. Кроме того, расчет производился с использованием т.н. моделей, основанных на структуре, суть которых в том [136], что вместо учета нековалентных взаимодействий из начальных принципов в потенциальной энергии учитываются т.н. контакты между атомами, существующие в экспериментально определенной структуре (в описываемой работе контакт учитывался в модели, если образующие его атомы находились ближе 4\AA в экспериментальной структуре и относятся к не соседствующим остаткам). Силовые константы всех ковалентных взаимодействий также заданы не обычным для молекулярной динамики образом. Такая модель неявно предполагает, что экспериментально определенной структуре соответствует глобальный энергетический минимум для данных биополимеров, так что даже полностью развернутая цепь будет ускоренно двигаться к нему в процессе молекулярно-динамического моделирования. Авторы построили две таких модели: одну для А/А-Р/Р, другую — для Р/Р-Е/Е-комплекса и задали объединенную модель в виде их взвешенной суммы, так что система располагала двумя «глобальными» энергетическими минимумами, между которыми и совершался переход.

В более ранней работе Санбонматсу и сотрудников, также касающейся транслокации, изучалась её кинетика [137]. Для этого было предпринято рекордное по продолжительности ($1,2\ \mu\text{s}$) моделирование 70S рибосомы *E. coli*, несущей две тРНК в А/А-Р/Р-состоянии. Исследователи определили три обобщенных координаты, описывающих процесс транслокации, именно: угол θ_{body} , отображающий вращение малой субъединицы относительно большой, угол θ_{head} , отображающий расхождение малой и большой субъединицы, и расстояние r_{tRNA} , представляющее собой расстояние между плечами обеих тРНК. Для изменения этих координат были оценены коэффициенты диффузии и частоты преодоления энергетических барьеров; последние составляют величину около $0,2\ \mu\text{s}^{-1}$. Энергетические барьеры, разделяющие фазы транслокации, не превышают, по оценкам авторов, $9 - 12k_B T$.

Брукс и др. смогли выявить потенциальную роль в процессе транслокации некоторых белков большой субъединицы рибосомы. Авторы моделировали 70S

рибосому *E. coli*, исходя из 17 структур, полученных подгонкой рентгеноструктурных данных к электронным плотностям, полученным методом криоэлектронной микроскопии. По результатам моделирования оценивалась кинетика переходов между выбранными 17 фазами транслокации и наблюдались согласованные движения тРНК и функциональных элементов рибосомных субъединиц. В частности, авторы нашли, что L1-протуберанец проталкивает тРНК в E-сайт [138].

Моделирование открытой сравнительно недавно обратной транслокации дало богатую информацию об основных фазах процесса прямой транслокации [139]. Электронную плотность комплекса, состоящего из 70S рибосомы *T. thermophilus*, двух тРНК в P/P-E/E-состоянии (пост-состоянии), мРНК и элонгационного фактора G вписывали в электронную плотность комплекса такого же состава, но содержащего 70S рибосому *E. coli* и тРНК в A/A-P/P-состоянии и A/P*-P/E-состоянии. Параллельно вписыванию производился расчет свободной энергии вдоль реакционного пути методом зонтичной выборки. Расчеты показали, что претранслокационное состояние превосходит по свободной энергии посттранслокационное на 2 – 3 ккал/моль, а энергетический барьер, преодолеваемый при обратной транслокации, превосходит посттранслокационное состояние на 8 ккал/моль. Кроме того, наблюдалось вращение малой субъединицы относительно большой по часовой стрелке (при прямой транслокации происходит вращение против часовой). Также наблюдалось открытие и закрытие т.н. «P/E-ворот», образованных остатками 16S рРНК G1338 и A1339 с одной стороны и остатком A790 с другой стороны. «P/E-ворота» широко раскрывались в претранслокационном состоянии, но были закрыты в промежуточном и посттранслокационном состояниях. Также наблюдались конформационные изменения в структуре элонгационного фактора G и изменения в его движении как целого.

В работе [140] изучалось взаимодействие малой и большой субъединицы в ходе транслокации. Для этого вписыванием модели рибосомы с тРНК и мРНК, основанной на рентгеноструктурных данных, в карты электронной плотности, полученные на основании данных криоэлектронной микроскопии, изготовили структуры тринадцати промежуточных состояний транслокации и из каждой запустили расчет молекулярной динамики протяженностью в 100 нс. По результатам анализа полученных траекторий авторы составили таблицу групп остатков 16S и 23S рРНК, образующих межсубъединичные контакты, и оценили энтальпии межсубъединичных контактов. Семь таких мостиков имели выраженно большие и устойчивые значения энтальпии. При этом при макроскопических движениях

малой субъединицы относительно большой контакты перестраиваются за счет смены взаимодействующих остатков, а не локальных структурных перестроек. Также оценивался энтальпийный вклад тРНК и мРНК в удержание большой и малой субъединиц вместе; оказалось, что тРНК сильнее связаны с большой субъединицей, а мРНК, как известно, связана только с малой, так что взаимодействие тРНК с малой субъединицей и мРНК являются «узким местом» энтальпийного вклада тРНК в стабилизацию 70S рибосомы. Также установлено, что 70S рибосома стабилизируется связыванием тРНК в Р-сайте больше, чем в А-или Е-сайтах.

2.3.1.4 Построение крупнозернистых моделей рибосомы

Сущность метода построения крупнозернистых моделей состоит в том, что моделируется взаимодействие не атомов, а крупных частиц, отображающих остатки или группы остатков. Смысл построения таких моделей в том, что они позволяют радикально понизить число частиц, для которых рассчитывается траектория, что существенно экономит вычислительные ресурсы и позволяет проводить моделирование больших промежутков времени. Это дает возможность наблюдать функционально важные движения рибосомы. Если рибосома содержит сотни тысяч атомов, то крупнозернистая модель — лишь сотни частиц, что позволяет экономить вычислительные ресурсы.

Пример такой модели представлен в работе [141], посвященной моделированию малой субъединицы рибосомы. Рибосомные белки рассматривались как сплошные тела. Аминокислотные остатки моделировались псевдоатомами соответствующих масс (С-атомами), которым приписывали координаты соответствующих C_α -атомов. Каждый псевдоатом связывался гармоническим потенциалом со всеми другими псевдоатомами, лежащими в пределах радиуса обрезания, причем равновесные длины связей получались из кристаллической структуры малой субъединицы. 16S рРНК моделировалась более сложным образом. Каждый остаток отображался псевдоатомом (Р-атомом), ассоциированным с атомом фосфора межнуклеотидной связи аналогично С-атому. Р-атомы связаны гармоническим потенциалом. Для остатков, лежащих в дуплексе, добавлялись дополнительные связи и валентные и торсионные углы, также представляемые гармоническими потенциалами. Каждой паре оснований сопоставлялся псевдоатом (Х-атом), заполняющий пространство и предотвращающий взаимопenetрацию дуплексов (Рис. 2.19). Объем, занимаемый псевдоатомами,

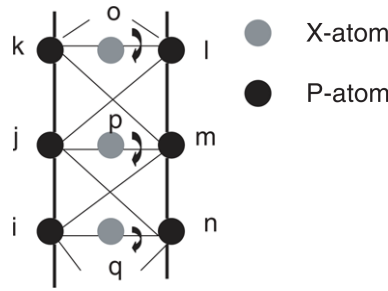


Рис. 2.19. Модель дуплекса. Псевдоатомы связаны псевдосвязями, требующимися, чтобы задать трехмерную структуру двойной спирали. Длины псевдосвязей и величины соответствующих углов выбраны в соответствии с идеальной двуспиральной РНК в А-форме. Псевдоторсионные углы $(i - j - m - n)$ нужны для того, чтобы сохранить правозакрученность двойной спирали.

моделируется параболическим потенциалом

$$U = \begin{cases} K_{nb} (r_{ij} - d_0)^2, & r_{ij} < d_0 \\ 0, & r_{ij} \geq d_0 \end{cases} \quad (2.92)$$

Кроме того, в модели предусмотрен потенциал РНК-белкового взаимодействия.

Другой пример крупнозернистой модели, опубликованный Санбонматсу и сотрудниками [142], был построен на основе траектории полноатомной молекулярной динамики. Сначала траекторию атомов преобразовали в траекторию центров масс остатков. Из полученной траектории методом наименьших квадратов удалили вращения и перемещения рибосомы как целого. Затем по преобразованной траектории центров масс построили матрицу ковариации $3n \times 3n$ и диагонализовали её, получив $3n$ собственных векторов Ψ_q и собственных значений λ_q . Ранжирование собственных векторов по убыванию их собственных значений и выбор N Ψ_q с самыми большими λ_q равнозначны разбиению рибосомы на N групп согласованно движущихся остатков. Кроме того, при этом отбираются $n_{ED} \ll 3n$ с наибольшими λ_q —выделяется «основное подпространство» из пространства собственных векторов, которое отвечает самым сильным движениям. В сущности, к анализу динамики рибосомы применили метод основных компонент. Выбор оптимального разбиения—числа N выбираемых Ψ_q осуществлялась минимизацией невязки

$$\chi^2 = \frac{1}{3N} \sum_{I=1}^N \sum_{i \in I} \sum_{j \geq i} \left((\Delta \mathbf{r}_i^{ED})^2 - 2\mathbf{r}_i^{ED} \cdot \mathbf{r}_j^{ED} + (\Delta \mathbf{r}_j^{ED})^2 \right) \quad (2.93)$$

где $(\Delta \mathbf{r}_i^{ED})^2$ есть среднее квадратичное отклонение i -го остатка от равновесного

положения в «основном подпространстве». Вычисляются они по формулам

$$(\Delta \mathbf{r}_i^{ED})^2 = \Delta \mathbf{r}_i^{ED} \cdot \Delta \mathbf{r}_i^{ED} \quad (2.94)$$

$$\Delta \mathbf{r}_i^{ED} \cdot \Delta \mathbf{r}_j^{ED} = \sum_{x=1}^3 \sum_{q=1}^{n_{ED}} \Psi_q^{ix} \lambda_q \Psi_q^{jx} \quad (2.95)$$

При этом разбиение согласовывалось с последовательностями белков и рРНК: в согласованно движущуюся группу объединялись лежащие в непрерывной последовательности остатки. При этом получалось, что оптимальным был размер группы в 20-30 остатков. Результатом этих манипуляций было представление рибосомы в виде совокупности масс, связанных между собой псевдосвязями, чьи параметры получались из траектории центров масс. Такая модель верно воспроизводила взаимодействия между субъединицами рибосомы, между белками и рРНК и между доменами внутри биополимеров.

2.3.2 Физико-химическое изучение рибосомного туннеля

Метод моделирования молекулярной динамики позволил получить ответы на несколько специфических вопросов, касающихся свойств рибосомного туннеля, что едва ли можно было сделать, используя существующие экспериментальные методы. Так, Панде и сотрудники [143] изучили свойства воды, заключенной в рибосомном туннеле. Была проведена симуляция молекулярной динамики для фрагмента большой субъединицы рибосомы, имеющего форму параллелепипеда и полностью включающего в себя рибосомный туннель, заполненный водой. По полученной траектории для воды были рассчитаны потенциал средней силы, вращательная энтропия, коэффициент диффузии и тензор флуктуации дипольного момента. Выяснилось, что коэффициент диффузии воды в туннеле понижен, равно как и понижена вращательная энтропия, что указывает на значительную упорядоченность молекул воды в рибосомном туннеле. На то же указывает и понижение значения следа тензора флуктуации дипольного момента по мере приближения к стенке туннеля. В целом, лишь на расстоянии порядка 0,5 нм от стенки свойства воды сколь-нибудь близки к свойствам воды в невозмущенном массиве.

В той же лаборатории было смоделировано взаимодействие боковых цепей аминокислот со стенками рибосомного туннеля [144]. Как и в описанной выше работе, обсчитывался лишь включающий в себя туннель параллелепипедальный фрагмент

рибосомы. На внутренний объем туннеля была наложена трехмерная сетка с шагом в 0,1 нм, в узлах которой располагались зонды — молекулы, имитирующие боковые цепи аланина, изолейцина, лизина, аспарагиновой кислоты и триптофана. При этом полипептидный остов заменялся атомами водорода, чтобы исключить его вклад в энергию взаимодействия. Зонды закреплялись в узлах гармоническим потенциалом с высокой константой жесткости и располагались так, чтобы расстояние между ними превосходило радиус обрезания невалентных взаимодействий. По полученным траекториям рассчитывали карты потенциала средней силы. Выяснилось, что при выходе из туннеля имеется энергетический барьер высотой около $6k_B T$ для остатков с крупными боковыми группами (изолейцин, лизин, триптофан) и около $1k_B T$ для остатков с малыми (аланин, аспарагиновая кислота). Для выражено гидрофобных остатков (изолейцин, триптофан) потенциал средней силы распределен вдоль длинной оси туннеля более равномерно и имеет более высокие значения, так что их нахождение в туннеле энергетически невыгодно. Энергетический ландшафт для заряженных остатков (лизин, аспарагиновая кислота) более имеет более сложную форму и зависит от заряда: там где у лизина максимум, у аспарагиновой кислоты—минимум. Кроме того, анализ траекторий показал наличие при выходе из туннеля своеобразных «ворот», образованных A497 23S рРНК и остатками аргинина белка L39, которые могут перекрывать нижнюю часть туннеля.

Работа [145] моделирует прохождение растущей полипептидной цепи по туннелю. Моделью растущего пептида служит полиаланиновая цепь. Прохождение цепи моделируется введением специальной силы, которая тянет цепь к выходу. Анализ траекторий указал на прохождение полипептидной цепи под остатком Arg-92 белка L22, который совместно с белком L4 перекрывает значительную часть туннеля до элонгации полипептида.

Ишидой и Хейвордом была предпринята попытка смоделировать котрансляционное сворачивание домена «цинкового пальца» внутри рибосомного туннеля [146]. Известно, что в нижней части рибосомного туннеля могут сворачиваться альфа-спирали; но в обсуждаемой работе методом криоэлектронной микроскопии и молекулярной динамики независимо было показано, что в той же зоне рибосомного туннеля могут формироваться и элементы третичной структуры. Сворачивание пептидов, состоящих из участка стоп-пептида SecM и домена «цинкового пальца», разделенных аминокислотной цепью разной длины, моделировалось молекулярной динамикой с обменом реплик при одновременном использовании крупнозернистой модели.

2.3.3 Моделирование рибосомных антибиотиков

Особое направление исследований рибосомы методом молекулярной динамики, имеющее непосредственное отношение к настоящей работе, представляет собой изучение связывания рибосомой специфичных к ней антибиотиков. Характерным примером здесь может служить работа Александрова и Симонсона, в которой изучалось связывание тетрациклина с малой субъединицей рибосомы [147]. По данным рентгеноструктурного анализа тетрациклин имеет, по крайней мере, два сайта связывания на малой субъединице: TET1 и TET5. Была проведена симуляция молекулярной динамики для сферических фрагментов малой субъединицы радиусом в 2,6 нм, в чьих центрах располагались сайты связывания тетрациклина. Авторам удалось рассчитать разницу между свободными энергиями Гиббса связывания тетрациклина по каждому сайту. Используя эту величину и экспериментальную константу ассоциации комплекса тетрациклин-рибосома, авторы рассчитали занятости обоих сайтов, оказавшиеся равными $\approx 100\%$ для TET1 и $\approx 57\%$ для TET5. Таким образом, был выявлен сайт, имеющий наибольшее сродство к тетрациклину.

Работа [148] посвящена изучению механизма связывания с рибосомой аминогликозидного антибиотика гентамицина. Предполагалось, что этот антибиотик, связываясь с малой субъединицей в районе А-сайта, закрепляет основания A1492 и A1493 в выпетленном состоянии, что приводит к выборке не соответствующих кодону aa-тРНК и синтезу белков с множественными ошибками. Проведенное моделирование показало, однако, что конформационную перестройку инициирует не связывание антибиотика в этом сайте, а, напротив, сами основания A1492 и A1493 случайным образом, несогласованно, то выпетливаются, то входят обратно в дуплекс, а гентамицин, способный образовывать менее специфические взаимодействия рядом со своим сайтом, как бы «вползает» в него, сначала занимая место одного из оснований в дуплексе и фиксируя его в выпетленном состоянии, а затем фиксируя другое. Особо стоит отметить, что в этой работе использовался метод молекулярной динамики с обменом реплик.

Аминогликозидам посвящена также работа Трыльски и сотрудников, изучавших молекулярные механизмы устойчивости к паромоцину [149]. Работа интересна тем, что в ней моделируется взаимодействие антибиотика не с целой рибосомой или её субъединицей, а с молекулой РНК, воспроизводящей ту спираль 16S рРНК, h44, с которой и связывается паромоцин. В модельную РНК вносились мутации G1491A,

G1491U, U1495C и U1406C. Симуляция молекулярной динамики в присутствии и в отсутствие паромомицина показала, как приводящие к изменению движения оснований A1492 и A1493 вызывают дестабилизацию спаривания оснований и ухудшение связывания антибиотика.

Связывание аминогликозидного антибиотика паромомицина с малой субъединицей бактериальной рибосомы и влияние на это связывание мутаций K42A и R53A в белке S12, опосредуемых изменением конформации остатков A1492 и A1493 А-сайта изучалось также в работе [150]. Известно, что эти мутации приводят к преувеличенно точному распознаванию аминоацил-тРНК в А-сайте 30S субъединицы, подавляя при этом действие аминогликозидных антибиотиков, которое, напротив, состоит в понижении избирательности рибосомы к аминоацил-тРНК. На основании анализа конформаций остатков A1492 и A1493 авторы предположили, что меньшая частота их выпетливания приводит к меньшему сродству малой субъединицы к приходящей аминоацил-тРНК, что делает её прочное взаимодействие с информационной РНК более значимой. Авторы высказали предположение, что причина этих изменений в динамике конформаций A1492 и A1493 кроется в перестройке сети водородных связей между 16S рРНК и белком S12, вызываемой заменой лизина или аргинина, чьи боковые цепи являются донорами водородных связей, на аланин, чья боковая цепь этим свойством не обладает.

В ряде работ осуществлялось моделирование молекулярной динамики комплексов антибиотиков с большой субъединицей бактериальной рибосомы. Мишенью для связывания большинства из них служат пептидилтрансферазный центр рибосомы и рибосомный туннель. Так, в работе [151] рассчитывали свободную энергию Гиббса связывания спарсомицина с большой субъединицей рибосомы методом возмущения свободной энергии. При этом в расчете участвовала не целая рибосома, а её фрагмент — сфера радиусом 1,5 нм, в центре которой находится Р-сайт большой субъединицы, с которым и связывается спарсомицин. Тем не менее, полученное значение хорошо согласовывалось с экспериментальными данными.

На первый взгляд, более детальные данные были получены Ямом и Вахабом [152], которые исследовали связывание эритромицина и рокситромицина с рибосомой. Кроме картины водородных связей, авторы рассчитали свободные энергии связывания методом ММ-РBSA (Poisson-Boltzmann Surface Area). Суть его в том, что свободная

энергия связывания вычисляется как

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{complex} - \Delta G_{receptor} - \Delta G_{ligand} \quad (2.96)$$

где $\Delta G_{complex}$, $\Delta G_{receptor}$, ΔG_{ligand} —свободные энергии комплекса, рибосомы и антибиотика, соответственно. Каждая из них рассчитывается по уравнению

$$\Delta G_{bind} = \langle E_{MM} \rangle + \Delta G_{solv} - T\Delta S \quad (2.97)$$

в котором $\langle E_{MM} \rangle$ есть средняя по траектории энергия молекулярной механики, вычисляемая как в уравнении (2.15), $T\Delta S$ —энтропийный вклад, энергия сольватации ΔG_{solv} состоит из полярного вклада ΔG_{PB} , рассчитываемого по уравнению Пуассона-Больцмана, и неполярного вклада ΔG_{SA} :

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{PB} + \Delta G_{SA} \quad (2.98)$$

$$\Delta G_{SA} = \gamma\Omega_{SA} + b \quad (2.99)$$

где Ω_{SA} площадь поверхности биополимера. Однако, полученные авторами величины энергии связывания довольно сильно отличаются от экспериментальных. Причина этого, по-видимому, заключается в том, что в цитированной работе рассчитывались только 2,5 нс траектории, из которых, судя по графикам среднеквадратичного отклонения, на уравнившуюся систему приходится всего 0,5 нс. К тому же, избранный метод расчета явным образом учитывает свойства растворителя, а между тем, судя по работе [143], его свойства сильно отличаются от свойств «в массиве». Вывод о преимущественном вкладе гидрофобных взаимодействий спорен по той же причине—непонятно, как меняется энтропия воды в рибосомном туннеле при связывании антибиотика.

Те же сложности возникают при анализе данных, полученных в работе Сайни и др., которые моделировали связывание антибиотиков линезолида и радезолида, относящихся к семейству оксазолидинонов, с рибосомами *Haloarcula marismortui* и *Deinococcus radiodurans* и рассчитывались свободные энергии связывания методом ММ-РBSA [153].

Интересных результатов можно было ожидать от применения моделирования молекулярной динамики для описания воздействия связывания антибиотиков

макролидов на функционирование пептидилтрансферазного центра с тем, чтобы прояснить механизм останова трансляции стоп-пептидами семейства Erm [154]. Указывается, что воздействие макролидов является аллостерическим. При моделировании молекулярной динамики в присутствии эритромицина менялось распределение конформаций высокоподвижных остатков A2602 и U2585, относящихся к т.н. «консервативному кольцу»: эти остатки тяготели к образованию стопок с соседствующими в цепи остатками, вместо того, чтобы смещаться в просвет рибосомного туннеля. Однако никаких предположений относительно конкретного механизма передачи сигнала из сайта связывания макролидов в пептидилтрансферазный центр высказано не было.

Макролидам посвящена также работа Смола и др., в которой изучалось влияние N⁶-метилирования остатка A2058 или мутации A2058G на связывание кетолида телитромицина [155]. Известно, что N⁶-метилирование A2058 или его замена на гуанин приводят к устойчивости рибосомы к макролидам. В то же время телитромицин частично преодолевает влияние мутации A2058G, но не метилирования. Проведенное исследование показывает, что мутация A2058G сохраняет возможность для 2'-гидроксильной группы телитромицина участвовать в образовании водородной связи с рибосомой, делая, однако, её не донором протона, а акцептором протона N¹H гуанина. Водородная связь этой группы с N¹ A2058 сохраняется и при диметилировании последнего. Монометилирование же A2058 подавляет эту водородную связь, по-видимому, из-за нарушения стэкинг-взаимодействий с соседними остатками. Кроме того, при мутации A2058G сохраняется стэкинг-взаимодействие имидазол-пиридинового фрагмента телитромицина с уотсон-криковской парой A752-U2609, а при метилировании A2058 оно дестабилизируется. Объясняется это тем, что метилирование A2058, как указывалось выше, возмущает его стэкинг-взаимодействие с соседними остатками G2057 и A2059. Это возмущение передается с G2057 на остаток C2611 через уотсон-криковскую пару, с последнего через ковалентные связи на U2609. Вследствие этого ослабляются его водородные связи с A752 и нарушается взаимодействие с телитромицином. Это и снижает устойчивость комплекса телитромицина с рибосомой, несущей метилированный A2058. Стоит отметить остроумный подход, использованный при моделировании: расчет молекулярной динамики для выделенного участка обводнённой рибосомы (10000 шагов) перемежался с расстановкой молекул воды методом Монте-Карло с большим каноническим ансамблем (10000 шагов), что позволяло стабилизировать

более удачной сольватацией новые конформации, оптимизируемые молекулярной динамикой. Этот приём улучшал представительность получаемой при моделировании выборки состояний системы.

Молекулярно-динамическое моделирование комплекса рибосомы с макролидами эритромицином или телитромицином в присутствии взаимодействующего с антибиотиком стоп-пептида ErmVL применили в работе [156] для объяснения изменения специфичности последнего по отношению к антибиотикам. Пептид ErmVL с остатком аспарагиновой кислоты в десятом положении (природный пептид) вызывает остановку трансляции в присутствии и эритромицина, и телитромицина, тогда как ErmVL с глутаминовой кислотой в том же положении останавливает трансляцию в присутствии лишь эритромицина. Моделирование показало, что и для эритромицина, и для телитромицина в присутствии природного пептида понижается частота, с которой остаток лизина, связанный с тРНК в А-сайте оказывается ориентирован относительно сложноэфирной группы пептида в Р-сайте выгодным для атаки образом. При замене аспарагиновой кислоты на глутаминовую это явление наблюдается для эритромицина, но не для телитромицина; если же аспарагиновую кислоту заменить на тирозин, то выгодные взаимные ориентации субстратов пептидилтрансферазной реакции достигаются реже для телитромицина, чем для эритромицина. Авторы объясняют это тем, что γ -карбоксильная группа глутаминовой кислоты образует водородную связь с 4'-гидроксильной группой кладинозы эритромицина, что и сдвигает распределение ориентаций в сторону невыгодных для пептидилтрансферазной реакции в случае Glu10-мутанта. Такое взаимодействие невозможно в случае телитромицина, у которого отсутствует кладинозный остаток, и в случае эритромицина и природного ErmVL, остаток аспарагиновой кислоты которого не дотягивается до кладинозы.

Особняком стоит работа [157], посвященная изучению действия антибиотика тиострептона на связанную с ГТФазой область большой субъединицы рибосомы, включающую белок L11 и спирали 43 и 44 23S рРНК методами молекулярной динамики и кругового дихроизма. Анализируя полученные траектории методами анализа основных компонент, кластеризации в пространстве главных компонент и корреляционного анализа, авторам удалось установить, что тиострепток подавляет внутреннюю подвижность доменов белка, делая его более жестким, и меняет конформацию остатка A1067, стабилизируя его *анти*-конформацию. Остаток A1067 же важен для узнавания тРНК и факторов элонгации. Недостатком работы можно считать то, что моделируемая система включала в себя исключительно белок L11

и спирали 43 и 44 (остатки с 1051 по 1108), причем без каких-либо ограничений. Эта особенность построения моделируемой системы, с одной стороны, оставляет сомнения в воспроизведении пространственной структуры 23S рРНК при расчете, с другой стороны, не позволяет быть полностью уверенным в поддержании правильной структуры комплекса 23S рРНК с белком L11 и, наконец, приводит к понижению скорости расчета.

2.3.4 Заключение

Анализ работ, в которых методы молекулярной динамики применялись для моделирования тех или иных аспектов функционирования рибосомы, показывает, что молекулярно-динамическое моделирование успешно и плодотворно применяется для исследования рибосомы. Молекулярная динамика позволяет моделировать структуры состояний рибосомы, едва ли обнаружимых экспериментально, и оценивать их энергетические характеристики, как в [122] или в [155], исследовать физико-химические характеристики стенок рибосомного туннеля или упорядоченность воды в нем, и, самое важное, моделировать сложные согласованные движения и конформационные перестройки в структуре рибосомы, происходящие при её функционировании [135] или возбуждаемые связыванием антибиотиков [154]. Такие структурные методы, как рентгеноструктурный анализ или, в меньшей степени, криоэлектронная микроскопия, отображают статичные, замершие структуры тех или иных состояний рибосомы, по которым не всегда возможно восстановить детальный, на атомном уровне, механизм происходящих в рибосоме процессов и динамические свойства интересующих нас участков структуры рибосомы. Кроме того, эти структурные методы отображают свойства ансамблей рибосом, к тому же, находящихся не вполне в естественной среде раствора (особенно это касается рентгеноструктурного анализа). Молекулярная динамика же позволяет смоделировать (естественно, опираясь на доступные структурные и иные экспериментальные данные) именно развитие протекающих в рибосоме процессов во времени и в среде водного раствора нужных ионов. Приведенная выше литература свидетельствует о том, что такое моделирование вполне достоверно и отображает наблюдаемые на макроскопическом уровне явления, как-то: различия в чувствительности антибиотиков к стоп-пептиду [156] или торможение синтеза пептида из-за внедрения D-аминокислоты [132]. Таким образом, применение методов молекулярной динамики

к моделированию структуры и функционирования рибосомы и её комплексов со всевозможными лигандами оправданно и результативно, хотя и может потребовать больших затрат процессорного времени из-за крупного размера моделируемого объекта.

Глава 3

Результаты и их обсуждение

3.1 Изучение связывания тилозина

Изложение результатов настоящей работы стоит начать с небольшого введения, объясняющего её происхождение. В нашей лаборатории вели исследования рибосомного туннеля, получая различные производные 16-членного макролидного антибиотика тилозина и измеряя степень подавления ими трансляции в системе *in vitro* [158–160]. Конструирование производных основывалось на структуре комплекса тилозина с рибосомой археи *H. marismortui* (код PDB: 1K9M) [96]. Эта работа давала интересные, но не всегда объяснимые результаты. Причиной возникших затруднений было то, что эксперименты выполнялись на рибосомах *E. coli*, сайт связывания макролидов которых значительно отличается от такового археи *H. marismortui*. Таким образом, требовалось получить обоснованное представление о структуре комплекса тилозина с рибосомой *E. coli* и образуемых им со стенками рибосомного туннеля взаимодействиях. Эта задача могла быть решена с использованием метода моделирования молекулярной динамики; выполнить же это моделирование предложили автору настоящей работы.

Для выполнения описанного выше моделирования прежде всего необходимо было ввести в структуру большой субъединицы рибосомы *E. coli* модифицированные нуклеотидные остатки, которые во множестве в ней содержатся, причем в непосредственной близости от сайта связывания макролидов находится шесть таких остатков (m¹G745, Ψ746, m⁵U747, m²A2503, Ψ2504 и Ψ2580), могущих существенно влиять на связывание тилозина. На тот момент ещё не были доступны структуры рибосом с расставленными модифицированными остатками,

поэтому расстановку модификаций пришлось выполнять самостоятельно. В качестве исходной нами была выбрана структура комплекса эритромицина А с рибосомой *E. coli* (код PDB: 4V7U) [25], в которой были расставлены структуры модифицированных рибонуклеотидных остатков. Полученная структура была оптимизирована методами молекулярной механики, причем немодифицированные остатки в ходе оптимизации были полностью зафиксированы и не двигались, модифицированные остатки, ионы и молекулы воды двигались, а эритромицин был изъят из структуры. Естественно, молекулярно-механическая оптимизация требовала подготовки молекулярно-механических параметров и топологий модифицированных нуклеотидных остатков, отсутствовавших в используемом силовом поле parm99sb [161]. Из оптимизированной описанным образом структуры был выбран кубический фрагмент, содержащий пептидилтрансферазный центр и рибосомный туннель, который и использовался в дальнейших расчетах (подробнее см. 4.1).

В этот фрагмент 50S субъединицы рибосомы *E. coli* посредством наложения на него структуры комплекса тилозина с рибосомой *H. marismortui* по структурно консервативным остаткам A2059, A2060, G2061, A2062 и A2503 была введена структура тилозина. Здесь нужно отметить, что структура комплекса рибосомы *E. coli* с эритромицином была взята в качестве исходной для того, чтобы при молекулярно-динамическом моделировании конформации остатков сайта связывания макролидов были ближе к конформациям, отвечающим связавшемуся тилозину, ведь эритромицин А также относится к семейству макролидов и даже частично структурно подобен тилозину. В ходе моделирования остаток микаминозы был протонирован по 3'-диметиламиновой группе, а тилонолид — макролактонное кольцо — был ковалентно связан с экзоциклической аминогруппой остатка A2062, образуя карбиноламиновую группу. Для описанной системы была получена траектория протяженностью в 600 пс.

На протяжении полученной траектории среднеквадратичное смещение центра масс (MSD) лактонного кольца тилозина составило около $0,01 \text{ нм}^2$ с понижением к концу траектории, что свидетельствует о устойчивости положения тилозина в сайте связывания. Среднеквадратичное отклонение атомов в фрагментах структуры тилозина, усредненное по фрагменту, примерно одинаково для остатков сахаров и лактонного кольца и составляет около $0,6 \text{ \AA}$, причем для остатка микарозы эта величина незначительно больше, чем для остальных фрагментов. Высокая устойчивость положения тилозина и малая подвижность его частей объясняются, кроме ковалентной связи с нуклеотидным остатком стенки туннеля, множеством

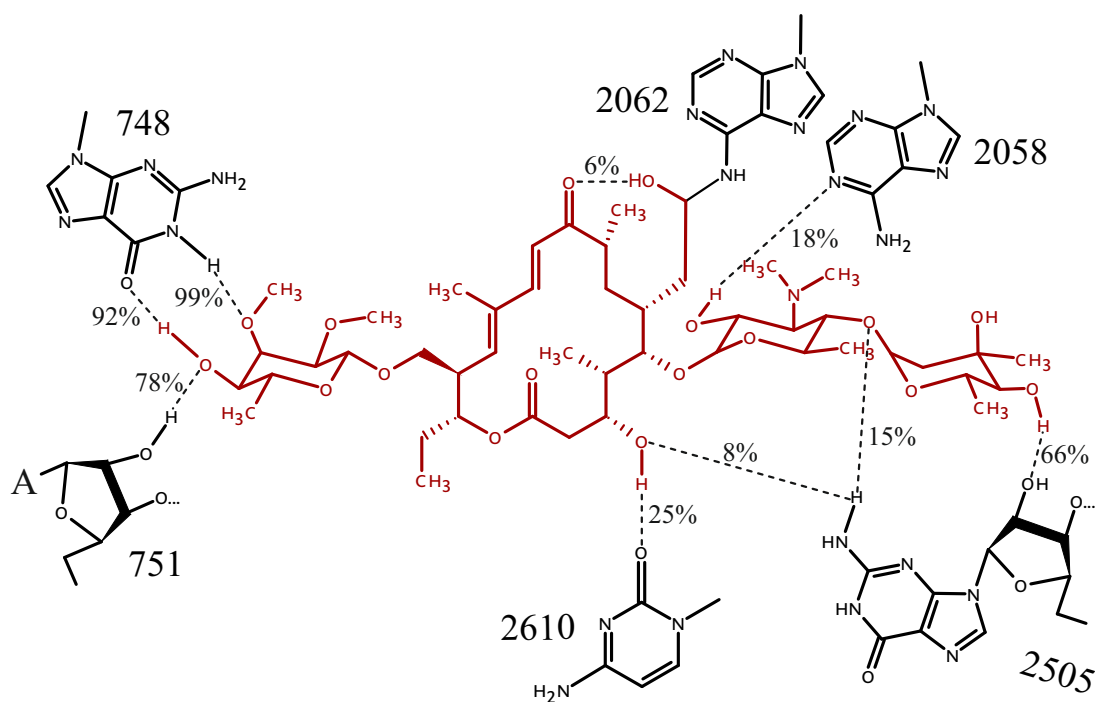


Рис. 3.1. Наиболее устойчивые водородные связи тилозина (выделен красным). Водородные связи изображены пунктиром, рядом подписана частота встречаемости.

водородных связей, образуемых им с нуклеотидными остатками сайта связывания — в каждом кадре траектории тилозин образует, в среднем, четыре водородных связи. Большая их часть создается остатками сахаров (Рис. 3.1), причем особенно прочные и многочисленные связи образует остаток мицинозы, порождающий две чрезвычайно прочных водородных связи с O6 и N1H нуклеотидного остатка G748 и одну чуть менее стойкую связь с 2'-гидроксильной группой остатка A751. Наблюдение водородных связей между тилозином и остатком G748 при молекулярно-динамическом моделировании согласуется с порождаемой метилированием основания G748 устойчивостью к тилозину [89], поскольку отвечающая за это метилтрансфераза TlrV метилирует гуанин G748 по 1-амидному азоту или 2-аминогруппе, что неминуемо должно подавлять образование одной из этих водородных связей. 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.

С помощью энергий нековалентных взаимодействий — суммы энергий кулоновских

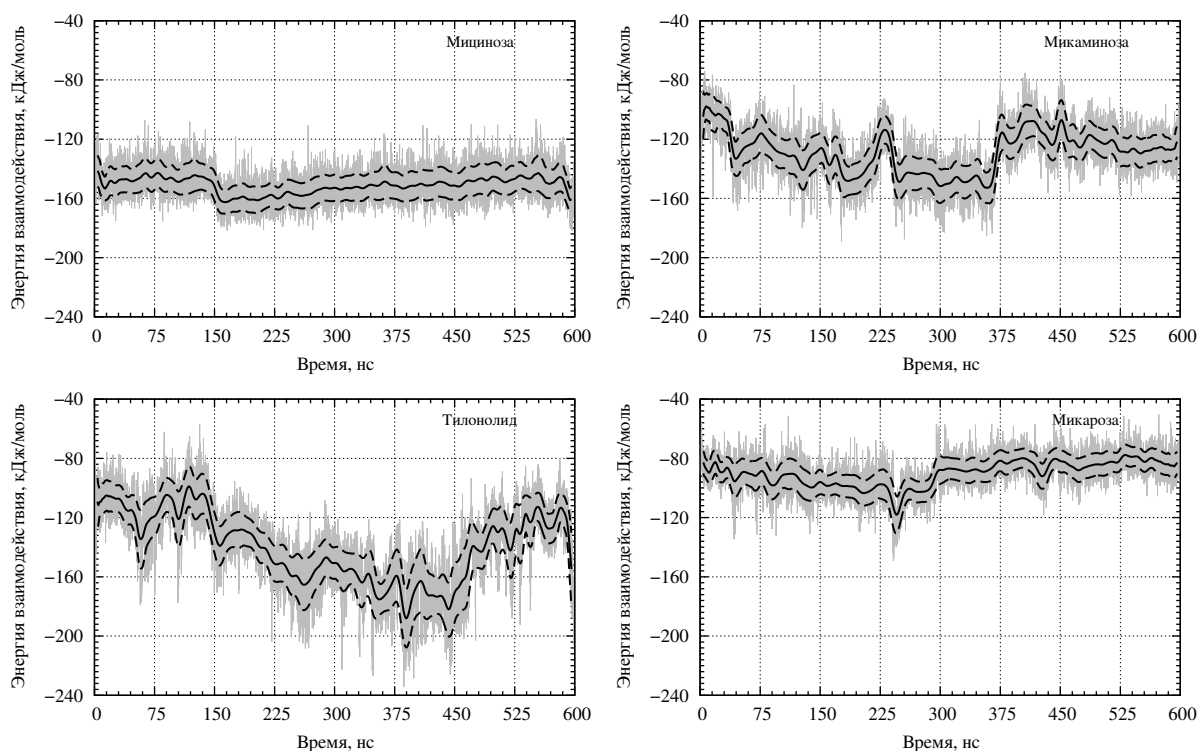


Рис. 3.2. Энергии нековалентных взаимодействий остатков тилозина с рибосомой. Серым показаны значения энергии невалентных взаимодействий, черной сплошной линией — значения энергии, сглаженные скользящим средним с окном 8 нс, черной пунктирной линией — скользящее стандартное отклонение.

и ван-дер-ваальсовых взаимодействий между называемыми группами атомов, вычисленной согласно параметрам силового поля parm99sb [161] — удобно сравнивать разные взаимодействия, возникающие в изучаемой системе. Эта величина **не является** свободной энергией Гиббса или Гельмгольца, а совпадение их размерности обусловлено формализмом молекулярной механики. Расчет этой величины говорит в пользу утверждения о основной роли остатков сахаров в связывании тилозина, если не учитывать возможность образования лактонным кольцом ковалентной связи с нуклеотидным остатком A2062. Так, наивысшая энергия взаимодействия тилонолида со стенками рибосомного туннеля, достигаемая в ходе моделирования, составляет около -160 кДж/моль, стабильно удерживаемых энергией нековалентных взаимодействий остатка мицинозы с сайтом связывания; остатки микаминозы и микарозы вносят в общую энергию по ~ -120 кДж/моль и ~ -80 кДж/моль соответственно (Рис. 3.2).

Если остатки сахаров в молекуле тилозина отвечают за образование водородных связей, то лактонное кольцо обеспечивает гидрофобный эффект¹ при связывании:

¹Как отмечалось ранее (2.3.2), вопрос о гидрофобном эффекте в рибосомном туннеле нетривиален. Из-за частичного упорядочения воды, зависящего от конкретной области в туннеле, её свойства

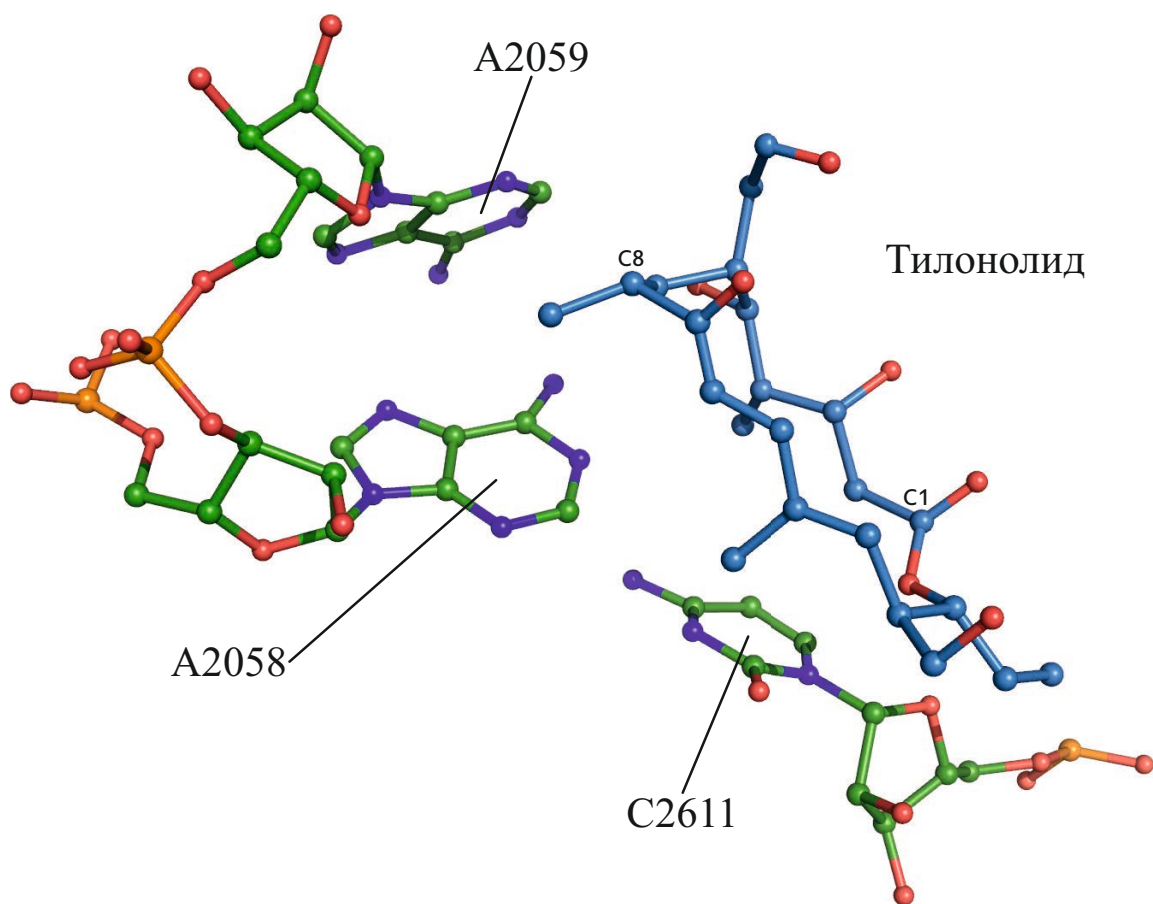


Рис. 3.3. «Гидрофобный карман», образуемый нуклеотидными остатками C2611, A2058 и A2059 (показаны зеленым), с которым взаимодействует лактонное кольцо тилозина — тилонолид (показано синим). Атомы водорода не отображены.

его конформация такова, что гидроксильные и карбонильные группы, сольватация которых выгодна, обращены в просвет рибосомного туннеля, а гидрофобные метильные группы — к стенкам рибосомного туннеля, так что лактонное кольцо встает на своеобразную «гидрофобную площадку», образованную плоскостями гетероциклических оснований A2058 и C2611 (Рис. 3.3). Эта «гидрофобная площадка» вместе с аденином A2059 образует так называемый «гидрофобный карман», в который входит 8-метильная группа лактонного кольца. При этом гетероциклические основания остатков A2058 и A2059, потенциально способные вступать в стэкинг-взаимодействие, раздвигаются, будучи как бы расклиненными участком лактонного кольца.

Высокоизбирательные нековалентные взаимодействия особенно важны для должны отличаться от свойств полностью свободной водной фазы; следовательно, гидрофобный эффект должен быть, по крайней мере, ослаблен. С другой стороны, удаление из просвета туннеля поверхности, требующей упорядочения соприкасающейся с ней воды, повышает энтропию воды, понижая её свободную энергию. Следовательно, гидрофобный эффект не должен совершенно исчезать. Таким образом, разумно полагать, что гидрофобный эффект действует в рибосомном туннеле, хотя и слабее, чем в свободной воде.

связывания тилозина, поскольку они выполняют такое его ориентирование в сайте связывания, которое оптимально для нуклеофильной атаки альдегидной группы тилозина экзоциклической аминогруппой аденина A2062, ведущей к образованию 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. Однако относительно такого ковалентного связывания возникают два вопроса. Во-первых, как такая реакция может быстро проходить при связывании тилозина, ведь экзоциклическая аминогруппа ароматической системы является малоактивным нуклеофилом? Во-вторых, почему взаимодействие аминогруппы и карбонильной группы останавливается на стадии карбиноламина, наблюдаемого в структуре комплекса, полученной методом рентгеноструктурного анализа [89]? Моделирование молекулярной динамики позволяет построить обоснованные ответы на эти вопросы. Относительно первого вопроса стоит отметить, что правильное взаимное расположение реагентов ускоряет протекание реакции между ними, что является одним из основополагающих принципов ферментативного катализа; нековалентное связывание тилозина, особенно образуемые им геометрически специфичные водородные связи, осуществляет такое оптимальное взаиморасположение альдегидной группы относительно аминогруппы аденина. Второй же вопрос разрешается тем, что при моделировании наблюдалась внутримолекулярная водородная связь между гидроксильной группой карбиноламина и 9-карбонильным кислородом тилонолида. Эта водородная связь стабилизирует карбиноламинную группу, углубляя соответствующий ей энергетический минимум, что затрудняет распад карбиноламина с образованием основания Шиффа. Кроме того, такая стабилизация карбиноламинной группы водородной связью сдвигает равновесие между карбиноламином и альдегидом и амином в сторону образования карбиноламина, облегчая ковалентное связывание не только кинетически, но и термодинамически.

Итак, молекулярно-динамические расчеты помогли смоделировать структуру комплекса тилозина с большой субъединицей рибосомы *E. coli* и описать связывание тилозина с физико-химических позиций. Это возбудило любопытство относительно динамических свойств рибосомного туннеля и действующих на него эффекторов, побуждая задавать вопросы, ответы на которые возможно было бы получить,

применяя методы молекулярной динамики. Например, как связываются в рибосомном туннеле другие антибиотики? Могут ли они вызывать какие-либо явления в областях рибосомного туннеля и пептидилтрансферазного центра, не входящих в сайт связывания этих антибиотиков и не находящихся в непосредственной от него близости? Если могут, то возникают эти явления из-за воздействия антибиотика на чувствительные элементы потенциально существующих в рибосомном туннеле механизмов, способных к распространению таких воздействий, или же из-за разрушения их антибиотиком? Каковы вообще динамические свойства образующих рибосомный туннель нуклеотидных остатков и способны ли они к согласованным движениям? Как на динамические свойства туннеля могут влиять химические модификации гетероциклических оснований, в частности, модификации, используемые бактериальной клеткой для защиты от действия антибиотика?

Из попытки ответить на некоторые из этих вопросов и родилась настоящая работа. Она потребовала, прежде всего, моделирования рибосомного туннеля, не несущего антибиотиков, стоп-пептидов или адаптивных химических модификаций, которое позволило бы составить представление о динамических свойствах рибосомного туннеля как такового и предоставило бы своеобразный образец для сравнения при дальнейших исследованиях. Моделированию свободного рибосомного туннеля посвящен следующий раздел этой главы.

3.2 Изучение механизма передачи аллостерических сигналов в рибосомном туннеле

Рибосомный туннель есть один из важнейших функциональных элементов рибосомы, отвечающий за вывод вновь синтезированной пептидной цепи из пептидилтрансферазного центра, образование ею элементов вторичной структуры и регуляцию трансляции. Закономерным образом эта область рибосомы, задействованная в столь важных клеточных процессах, является мишенью многих антибиотиков; это обстоятельство вовлекает рибосомный туннель в функционирование систем защиты бактериальной клетки от антибиотиков (см. 2.1.3). Эти функции едва ли могли быть выполняемы рибосомным туннелем, будь он инертным и статичным каналом, никак не отзывающимся на воздействия тех или иных взаимодействующих с ним эффекторов. Следовательно, рибосомный туннель является подвижной, динамической системой, каким-то образом реагирующей на проходящие по нему пептиды, связывающиеся в нем антибиотики и производимые с образующими его нуклеотидными остатками 23S рРНК.

Подтверждением динамического характера рибосомного туннеля служит управляемая продвигающейся по нему пептидной цепью остановка трансляции. Взаимодействие её определенных аминокислотных остатков с особыми, сенсорными нуклеотидными остатками, расположенными на стенках рибосомного туннеля, порождает сигнал, передающийся в пептидилтрансферазный центр. Последний, приняв этот сигнал, отключается и перестает наращивать пептидную цепь. Такую остановку может вызывать как пептид сам по себе, так и пептид совместно с низкомолекулярными кофакторами [162], в роли которых часто могут выступать макролидные и кетолидные антибиотики [163]. Явление остановки рибосомы производимым ей пептидом активно изучается [162]. Существует предположение о том, что рибосома *E. coli* содержит две цепи нуклеотидных остатков 23S рРНК, выступающих в роли пути передачи сигнала от сенсорных остатков в рибосомном туннеле в пептидилтрансферазный центр [164]. Один из вероятных путей, исходящий из нуклеотидного остатка A752, был исследован структурными и биохимическими методами, которые показали, что эритромицин смещает С-конец лидерного пептида эритромицин-зависимой метилтрансферазы ErmBL. Это смещение вводит его в контакт с пептидилтрансферазным центром, инактивируя последний и останавливая

трансляцию [165]. Удаленность сенсорных остатков от пептидилтрансферазного центра позволяет говорить об аллостерической передаче сигнала.

Познание механизмов действия рибосомного туннеля требует изучения динамики конформаций слагающих его нуклеотидных и аминокислотных остатков и скрепляющих его нековалентных взаимодействий. Однако экспериментальные структурные методы, применяемые к изучению рибосомы, такие, как рентгеноструктурный анализ или криоэлектронная микроскопия, едва ли могут предоставить сведения о множестве конформаций остатков, образующих рибосомный туннель, давая, однако, весьма точные сведения о «усреднённой» структуре рибосомы вблизи дна энергетического минимума, соответствующего тому или иному её функциональному состоянию. Эту проблему помогает решить метод молекулярной динамики, позволяющий моделировать движение крупных макромолекулярных комплексов в растворах во времени. Метод молекулярной динамики весьма основательно проработан и успешно применяется для моделирования рибосомы (см. 2.3), предоставляя информацию как о богатстве конформаций остатков составляющих её белков и РНК, так и о свойствах удерживающих её структуру межмолекулярных взаимодействий, как-то: водородных связей, ионных мостиков, Ван-дер-Ваальсовых и стэкинг-взаимодействий. Последнее особенно важно, поскольку помогает перейти от описания структуры рибосомы в том или ином её функциональном состоянии к её объяснению с позиций фундаментальных физико-химических знаний, к объяснению причин возникновения именно такой структуры и объяснению причин существования именно такого пути, по которому рибосома переходит от одного своего состояния к другому. Такой подход, с одной стороны, увязывает «высокоуровневые» биологические процессы с «низкоуровневыми» физико-химическими процессами, сближая частные научные дисциплины в целостное научное знание, с другой стороны, создает место теоретическому предсказанию биологических явлений хотя бы на уровне отдельных макромолекулярных комплексов, приближая этим молекулярную биологию к статусу предсказательной науки. Поэтому применение молекулярной динамики к исследованию рибосомы вообще и рибосомного туннеля в частности полезно и оправдано.

Для изучения динамики нуклеотидных остатков, составляющих рибосомный туннель, нами было предпринято молекулярно-динамическое моделирование центрального фрагмента большой субъединицы рибосомы *E. coli*, включающего весь пептидилтрансферазный центр и рибосомный туннель (см. 4.1). При этом наше внимание было сосредоточено на подвижности участка 2058-2063

23S рРНК и прилежащим к нему нуклеотидным остатком m²A2503, которые составляют участок стенки рибосомного туннеля в верхней его части. Эта область весьма интересна тем, что является одним из наиболее вероятных кандидатов на роль пути передачи аллостерического сигнала из рибосомного туннеля в пептидилтрансферазный центр [162–164], каковое предположение было экспериментально подтверждено [154; 165; 166]. Стоит учитывать и то, что нуклеотидные остатки A2058 и A2059 являются частью сайта связывания макролидов и кетолидов [167], а N6-диметилирование A2058 вызывает устойчивость к антибиотиками этого класса и некоторых других [168]. Мы попытались прояснить картину изменений конформаций нуклеотидных и аминокислотных остатков, слагающих рибосомный туннель, которые могли бы осуществлять передачу аллостерических сигналов, отводя особое внимание влиянию конформаций в указанном выше участке рибосомного туннеля на конформацию пептидилтрансферазного центра.

Для моделируемого фрагмента рибосомы были получены двадцать три траектории продолжительностью от 200 нс до 360 нс. При их анализе были обнаружены конформационные переходы, в которых участвовали и некоторые нуклеотидные остатки пептидилтрансферазного центра, и остатки, принадлежащие указанному выше участку рибосомного туннеля. 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» пептидилтрансферазного центра, изменяется так, что его основание образует стэкинг-взаимодействие с основанием C2063. Иногда эти события происходят поодиночке, иногда — совместно, причем в части траекторий (шести из двадцати трех) 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

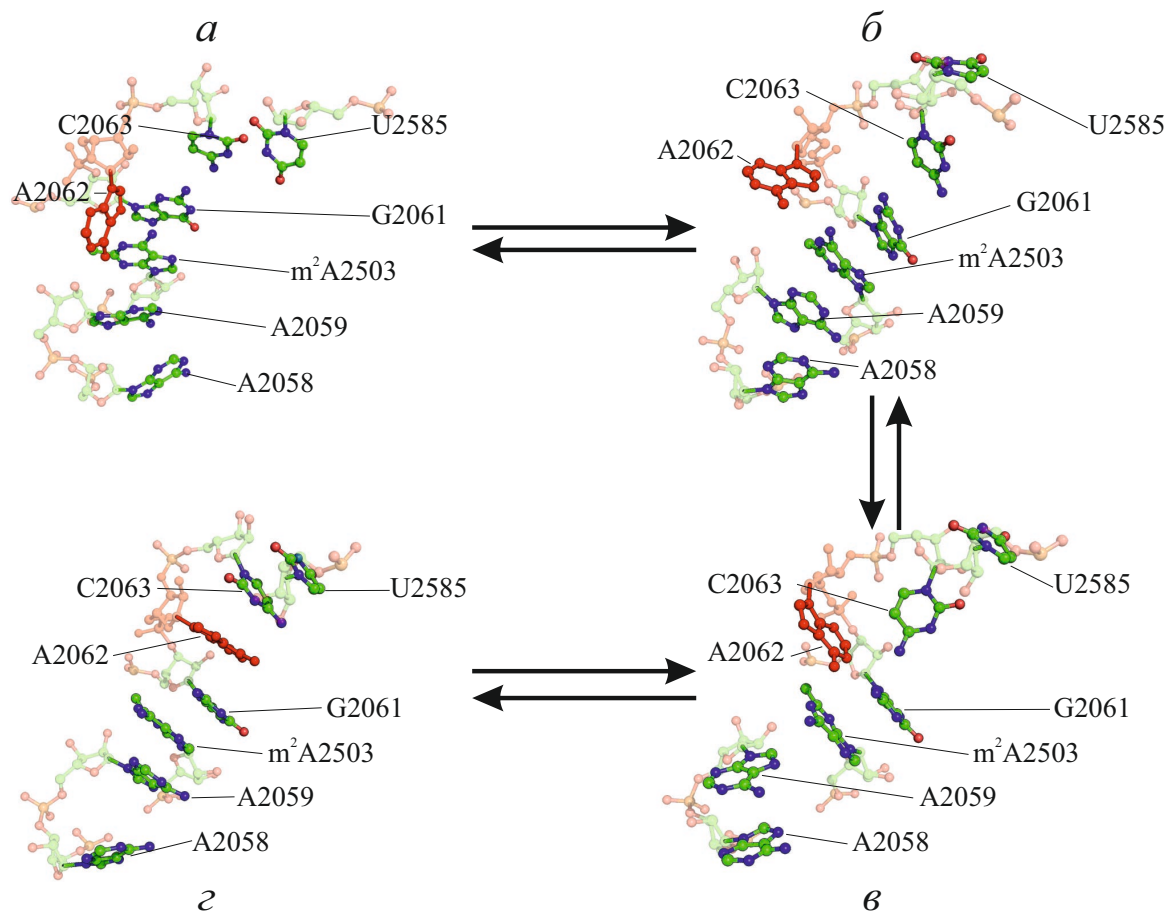


Рис. 3.4. Основные фазы конформационного перехода в участке A2058-C2063 23S рРНК рибосомы *E. coli*, наблюдаемого посредством моделирования молекулярной динамики: *a* — начальная (4 нс); *b* и *d* — промежуточные (71 и 117 нс соответственно) и *c* — конечная (353 нс) стадии. Нуклеотидный остаток A2062 выделен сплошным красным.

стопкообразную структуру (Рис. 3.4).

Этот конформационный переход отображается изменением торсионных углов β , γ , δ и χ , описывающих конформацию тридцати четырех нуклеотидных остатков вблизи исследуемого участка рибосомного туннеля и пептидилтрансферазного центра (Рис. 3.5). Согласованность движений видна и в проекции значений указанного выше набора торсионных углов на первые главные компоненты, полученные анализом главных компонент (см. 4.3) этих данных (Рис. 3.6). Первая главная компонента объясняет 45% дисперсии исходных данных, вторая — 25%, третья — 14% и четвертая — 3%; первые четыре компоненты объясняют 86% дисперсии исходных данных, так что остальными компонентами можно пренебречь.

Конформационный переход хорошо иллюстрируется происходящими во времени изменениями значений нековалентных (электростатических и Ван-дер-Ваальсовых) взаимодействий [169], отвечающих за ассоциацию гетероциклических оснований

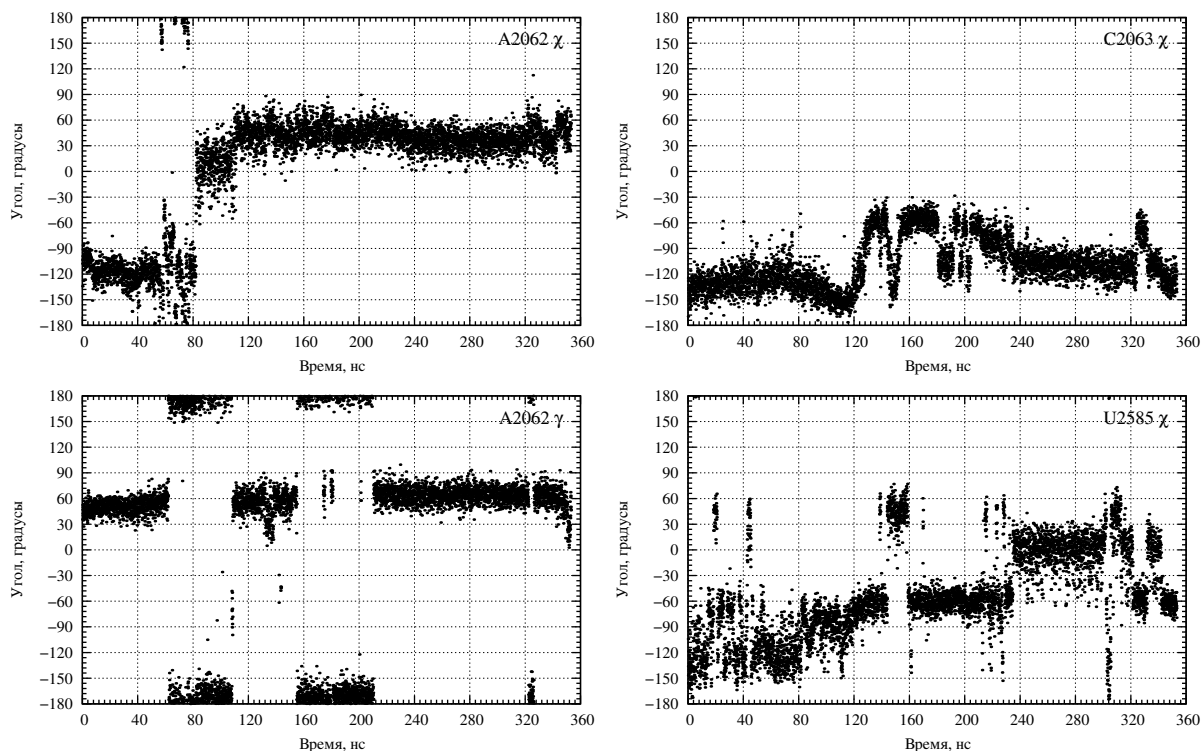


Рис. 3.5. Значения торсионных углов некоторых нуклеотидных остатков участка A2058–C2063 и U2585, наиболее сильно изменяющихся при описываемых конформационных переходах.

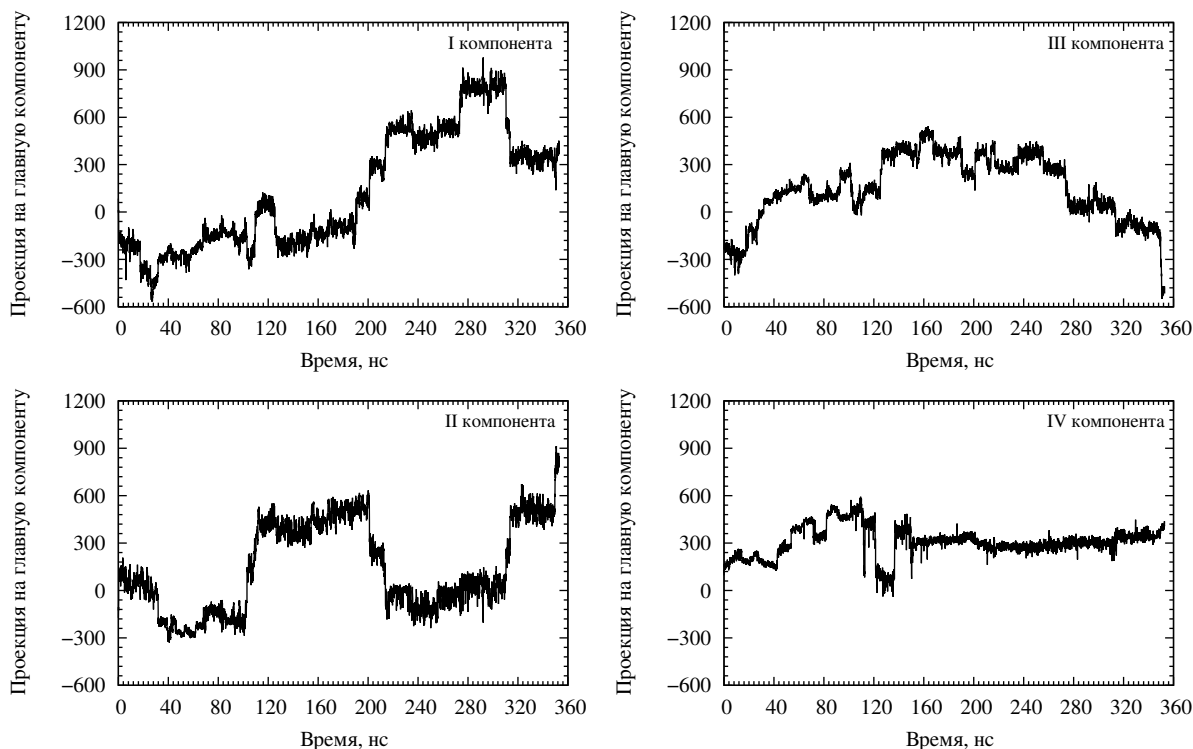


Рис. 3.6. Проекция значений торсионных углов 34 нуклеотидных остатков изучаемой области на первые четыре главных компоненты.

соседствующих нуклеотидных остатков (Рис. 3.7). Нужно особо отметить, что изменения и энергий, и углов происходят не одновременно, но последовательно,

разбиваясь на три основных описанных ранее группы. Притом, если эти конформационные изменения происходят по отдельности, то они не завершаются и не приводят к устойчивым структурам, но когда эти изменения включены в единый конформационный переход, то он доходит до образования стабильной структуры.

Важно то, что наблюдаемые нами изменения конформаций нуклеотидных остатков в сегменте A2058–C2063 и соприкасающихся с ним нуклеотидных остатков m²A2503 и U2585 обратимы, что было установлено с помощью метода метадинамики (см. 2.2.2.3). Мы выбрали в качестве обобщенных переменных пять торсионных углов, описывающих конформацию участвующих в переходе нуклеотидных остатков, опираясь на результаты проведенного для них анализа основных компонент: выбирались углы, вносящие наибольший вклад в первую главную компоненту. С выбранными обобщенными координатами запустили метадинамику, исходя из состояния, достигаемого моделируемой системой в конце конформационного перехода (Рис. 3.4,з). Взвешивающий потенциал подстраивали, добавляя к нему пятимерные гауссовы функции высотой 1 кДж/моль и шириной 0,15 радиан с периодичностью 1000 шагов (2 пс) до тех пор, пока на нем не появился второй максимум. Это указывало на то, что взвешивающий потенциал компенсировал минимум, в котором оказалась система после конформационного перехода, так что она перешла в соседний. Состояния в полученной таким образом траектории кластеризовали, получив 21 кластер, и отобрали 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 состояния системы, находящиеся вблизи не дна энергетического минимума, а седловой точки на ландшафте свободной энергии, могли преодолеть её в равновесной динамике за счет единственно кинетической энергии и случайных флуктуаций скоростей. Действительно, в части траекторий система осталась в состоянии, близком к тому, из которого развивается конформационный переход (Рис. 3.4,а). Это говорит об обратимости описываемого конформационного перехода. Заметим, что именно способность системы обратимо переходить между устойчивыми состояниями говорит о её способности сохранять макроинформацию, что указывает на возможную функциональную роль этого перехода [170].

Нужно заметить, что изменения конформаций, могущие происходить в триаде нуклеотидных остатков 23S рРНК G2061-A2062-C2063 при воздействии стоп-пептида SecM, ранее изучались посредством моделирования молекулярной динамики

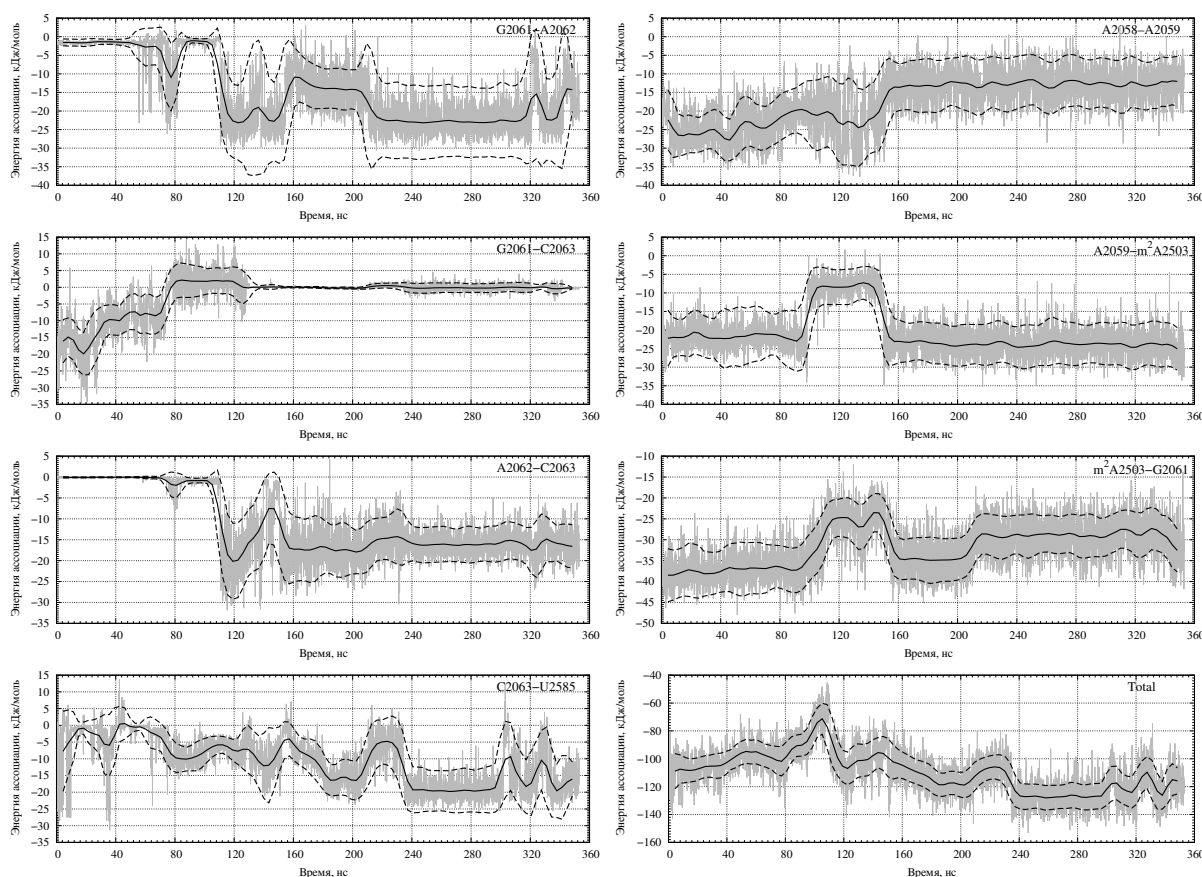


Рис. 3.7. Энергии нековалентных взаимодействий для пар азотистых оснований, вступающих в стэкинг-взаимодействия при описываемом конформационном переходе. Серым показаны значения энергии нековалентных взаимодействий, черная сплошная линия — значения энергии, сглаженные скользящим средним с окном 9 нс, черный пунктир — скользящее стандартное отклонение. Нижний правый график показывает изменение суммарной энергии нековалентных взаимодействий оснований в изучаемом участке 23S рРНК.

Гумбартом и соавторами [171]. Из данных, предоставляемых этой работой, следует, что при передаче функционального сигнала в пептидилтрансферазный центр порядок оснований в этом структурном элементе не меняется относительно порядка нуклеотидных остатков. Но в этой работе расчет молекулярной динамики останавливался на 20 нс, чего, по нашим данным, недостаточно для развертывания конформационного перехода.

Следует полагать, что движущие силы наблюдаемого нами конформационного перехода, претерпеваемого сегментом A2058-C2063, заключаются в гидрофобном эффекте и стэкинг-взаимодействиях. Ведь при его развертывании убывает гидрофобная поверхность системы (Рис. 3.8), поскольку основания нуклеотидных остатков A2062 и U2585, в исходной структуре пребывавшие в просвете рибосомного туннеля, вступают в стэкинг-взаимодействия со своими новыми соседями. Действительно, на рис. 3.7 видно, что энергетический выигрыш достигается за

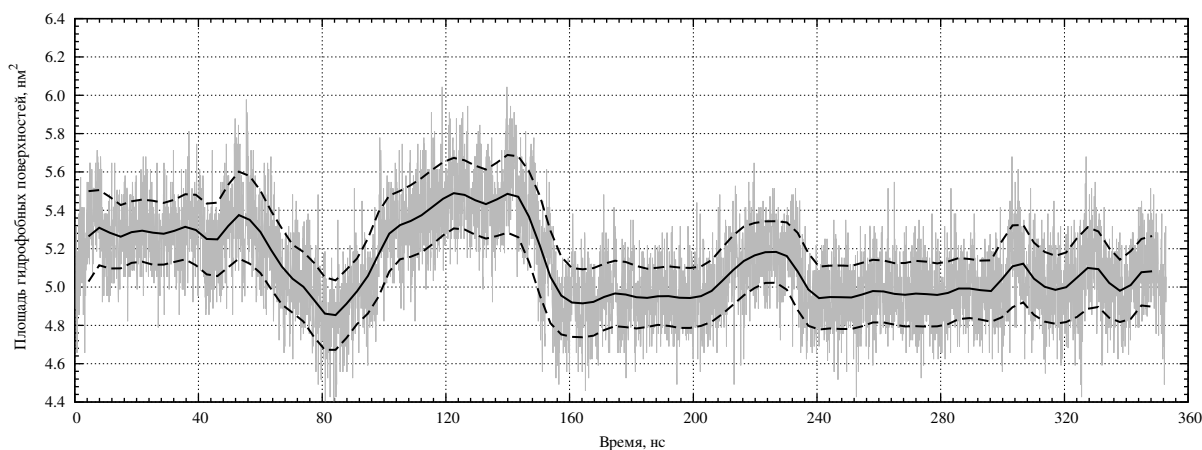


Рис. 3.8. Изменения площади гидрофобных поверхностей нуклеотидных остатков A2058-C2063, m²A2503 и U2585 при разворачивании конформационного перехода.

счет вхождения основания A2062 между C2063 и G2061 и образования контакта между C2063 и U2585; изменение энергии нековалентных взаимодействий составляет -19 ± 10 кДж/моль. 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.

Рассмотрим участвующие в наблюдаемом нами конформационном переходе нуклеотидные остатки в свете имеющихся литературных данных. Выше указывалось, что разворачивание конформационного перехода начинается с того, что адениновые основания нуклеотидных остатков A2058 и A2059 сходятся. Эти основания образуют на стенках рибосомного туннеля т.н. «гидрофобный карман» (см. 2.1.3), в который входит лактонное кольцо макролидных и кетолидных антибиотиков при их связывании с большой субъединицей рибосомы [96; 172]. Сближение азотистых оснований A2058 и A2059 было ожидаемо, так как при построении моделируемой системы макролид эритромицин был изъят из «гидрофобного кармана» (см. 4.1), а по сравнению со свободной рибосомой (PDB ID: 4V4Q), в связавшей эритромицин рибосоме (PDB ID: 4V7U) эти основания разведены. Важно то, что при моделировании контрольных систем, в которых конформация этих двух нуклеотидных остатков была зафиксирована, конформационный переход в изучаемом участке рибосомы не разворачивался.

Но наиболее сильные конформационные перестройки в исследуемой области, как следует из рис. 3.4, обусловлены изменением конформации нуклеотидного остатка A2062, абсолютно консервативного и обладающего чрезвычайной подвижностью.

Высочайшая подвижность этого нуклеотидного остатка сохраняется для всех рибосом, что понуждает подозревать о необходимости этого свойства A2062 для правильной работы рибосомы. В большей части существующих кристаллических структур рибосом остаток A2062 имеет конформацию с направленным в просвет рибосомного туннеля гетероциклическим основанием (например, структуры 1VQL, 4V5D и 3OFR); такую его конформацию будем называть «открытой». Но в некоторых структурах рибосомы адениновое основание в A2062 развернуто относительно остатка рибозы так, что его плоскость почти параллельна стенке рибосомного туннеля (например, структуры 1KQS, 4V7X и 3OFQ); такую конформацию назовем «закрытой». Проведенное в этой работе моделирование молекулярной динамики показывает, что нуклеотидный остаток легко переходит из «открытой» в «закрытую» конформацию, причем «открытая» конформация оказывается предпочтительной (Рис. 3.9). При этом моделировании мы исходили из структуры большой субъединицы рибосомы *E. coli* (PDB ID: 3OFR²), несущей A2062 в «открытой» конформации. В ходе расчета его конформация быстро переходит в «закрытую» (Рис. 3.4, фаза *a*, соответствующая 4 нс траектории), что отображается и на схеме водородных связей A2062 с соседями (Рис. 3.10,А). В кристаллических структурах большой субъединицы рибосом *H. marismortui* и *E. coli* остаток аденина A2062, пребывающий и в «открытой», и в «закрытой» конформациях, образует водородные связи с остатком 2-метиладенина в остатке m²A2503 [173], входящего в пространственной структуре рибосомы между азотистыми основаниями A2059 и G2061. На схеме 3.10,А, видно, что поначалу A2062 создает с m²A2503 нестабильную транс-уотсон-криковскую/хугстиновскую А-А-пару (по классификации Вестхофа и сотрудников [174]), которая разрушается на начальном этапе исследуемого конформационного перехода, позволяя A2062 в последующем вклиниться между нуклеотидными остатками G2061 и C2063. Как указывалось ранее, этому внедрению предшествует изменение конформации C2063, приводящее к потере его стэкинг-взаимодействия с G2061 (Рис. 3.4 и 3.5). При всех этих изменениях нуклеотидный остаток m²A2503 образует стэкинг-взаимодействия со своими соседями A2059 и G2061, которые ослабляются только в период между 90 и 150 нс (Рис. 3.7).

Предположение о важности нуклеотидного остатка A2062 для функционирования

²В Методах (2.1.3) в качестве исходной указана структура 4V7U. Она изображает целую ячейку кристалла 70S рибосом *E. coli*, связавших эритромицин. До 2014 года она представлялась в банке PDB четырьмя файлами, изображавшими по отдельности две малых и две больших субъединицы — 3OFO, 3OFP, 3OFQ и 3OFR соответственно. Так получилось, что теперь один код PDB указывает на две структуры с разной конформацией A2062, поэтому здесь для определенности указаны коды старых структур, которые ещё можно извлечь из банка данных.

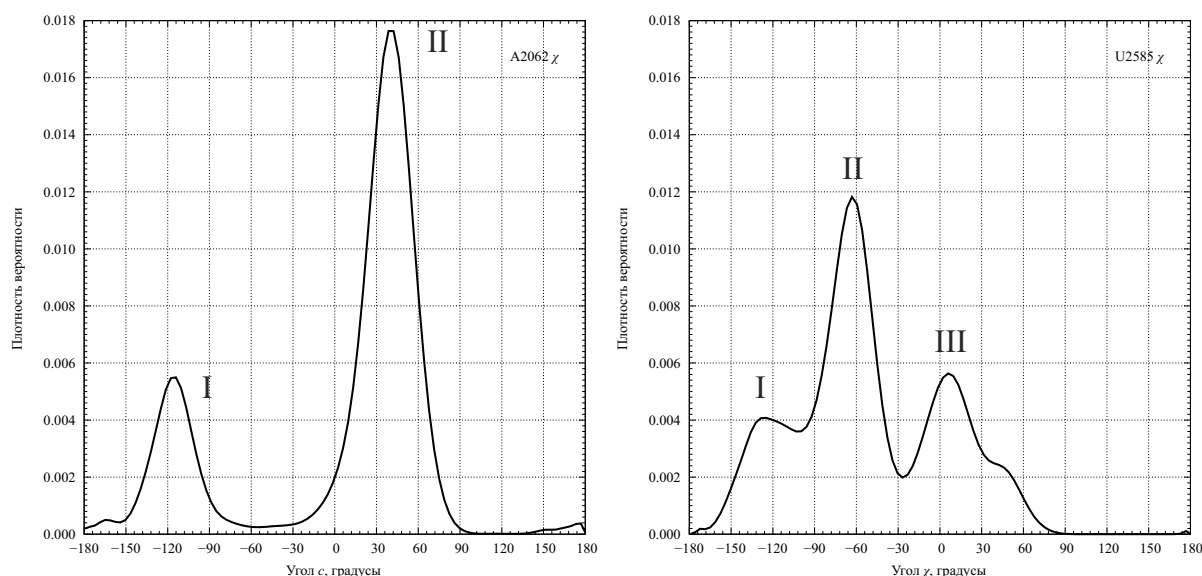


Рис. 3.9. Распределение значений торсионных углов χ нуклеотидов A2062 и U2585. В распределении значений угла χ основания A2062 пик I соответствует фазам *a* и *б* (рис. 3.4), пик II фазам *в* и *г* (рис. 3.4). В распределении значений угла χ основания U2585 пик I соответствует фазе *a*, пик II – фазам *б* и *в*, пик III – фазе *г* (рис. 3.4).

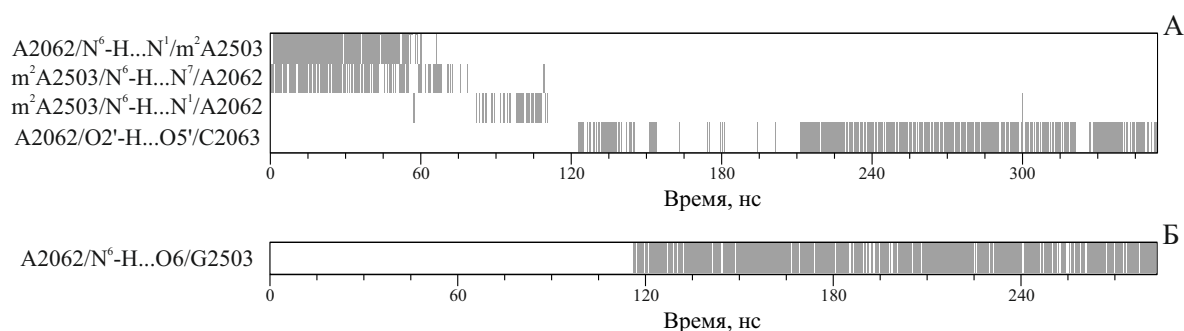


Рис. 3.10. Схема, показывающая образование основных водородных связей нуклеотида A2062 при моделировании молекулярной динамики. Серая вертикальная черта отражает существование указанной водородной связи в данный момент времени. А: обычная система; Б: карта водородных связей нуклеотида G2503, полученная из траектории с мутацией A2503G *in silico*.

рибосомы появилось вскоре после определения её пространственной структуры [175] и впоследствии было подтверждено трудами Манькина с сотрудниками [83]. Известно, что мутации по положению 2062 23S рРНК полностью подавляют остановку трансляции стоп-пептидами, однако мало влияют на работу пептидилтрансферного центра рибосомы. На основании этих фактов появилось предположение о том, что остаток A2062 участвует в передаче аллостерического сигнала в пептидилтрансферный центр из удаленных от него областей рибосомного туннеля, а мутации A2062 обрывают эту передачу. Аналогичные данные были получены той

же группой исследователей и относительно нуклеотидного остатка m²A2503 [173]. 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* подавили развертывание описанного выше конформационного перехода, причём разным образом. 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 меньших по сравнению с аденином размеров гетероциклического основания и 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. 3.10,Б), что препятствовало изменениям конформации последнего, необходимым для развертывания конформационного перехода.

Порядок, в котором расположены гетероциклические основания в возникающей в конформационном переходе триаде G2061-A2062-C2063, соответствует вторичным структурам известных 23S рРНК, но не наблюдается в структурах рибосомы, полученных методами рентгеноструктурного анализа или криоэлектронной микроскопии. В них остатки G2061 и C2063 соприкасаются друг с другом гетероциклическими основаниями, а аденин остатка A2062 или находится в просвете туннеля («открытая» конформация), или расположен вблизи G2061, но не C2063 («закрытая» конформация). Остатки G2061 и C2063 принадлежат т.н. «внешнему слою» пептидилтрансферазного центра [176] и отвечают за поддержание правильной конформации нуклеотидного остатка A2451, одного из важнейших элементов пептидилтрансферазного центра [23; 177]. Замена G2061 и C2063 на другие нуклеотидные остатки сильнее всего влияет на активность рибосомы [178; 179], почему можно полагать, что изменения конформации C2063, к 80 нс приводящие к потере им контакта с G2061, должны отражаться на эффективности пептидилтрансферазной реакции.

Преобразование сегмента G2061-A2062-C2063 с вынесенным A2062 в триаду нуклеотидных остатков, связанных стэкинг-взаимодействиями, приводит к возникновению устойчивого ассоциата C2063 и U2585, который стабилизируется к 240 нс (Рис. 3.7). Достоверно установлено, что нуклеотидные остатки C2063, A2451, U2585 и U2586 играют ключевую роль в катализе пептидилтрансферазной реакции [180]. Также известно, что в каждом цикле наращивания пептидной цепи

аминоацил-тРНК, один из субстратов пептидилтрансферазной реакции, вызывает подгонку конформаций этих нуклеотидных остатков под структуру своего 3'-концевого участка и ацилировавшей его аминокислоты [54]. Таким образом, конформация ансамбля этих нуклеотидных остатков должна легко перестраиваться. При этом известно, что нуклеотидный остаток U2585 крайне подвижен. Отсюда следует, что удаление U2585 от оптимальной для прохождения пептидилтрансферазной реакции конформации с закреплением в таком положении должны приводить к инактивации рибосомы. Действительно, U2585, образовавший контакт с C2063, препятствует связыванию 3'-конца пептидил-тРНК в Р-сайте пептидилтрансферазного центра.

Наблюдаемые нами согласованные изменения конформаций нуклеотидных остатков в сегменте A2058-C2063 обратимы и совершаются со скоростью, превышающей скорость пептидилтрансферазной реакции на несколько порядков. Таким образом, чтобы это изменение конформаций воздействовало на активность рибосомы (например, надолго останавливали её работу), необходимо, чтобы оно было чем-нибудь зафиксировано. Эту фиксацию может осуществить стоп-пептид. Недавние усовершенствования метода криоэлектронной микроскопии, увеличившие его разрешающую способность, позволили определять положение и конформацию стоп-пептидов в рибосомном туннеле [154; 165; 181–183]. Только в работе Аренца с сотрудниками [165] отмечалось закрепление конформации U2585, происходящее в том случае, если в рибосоме *E. coli* одновременно находились эритромицин и стоп-пептид ErmBL, причем это закрепление обеспечивалось стэкинг-взаимодействием U2585 с соседним остатком U2586, а не C2063. Кроме того, в этой работе не было отмечено заметных изменений конформации сегмента A2058-C2063 (смотри структуру с кодом PDB 3J5L).

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 рибосомному туннелю 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 пептидилтрансферазном центре тРНК, могут останавливать трансляцию [184]. Эта остановка обусловлена их взаимодействиями с нуклеотидными остатками рибосомного туннеля, находящимися в непосредственной близости от пептидилтрансферазного центра. 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.

3.3 Изучение механизма устойчивости к антибиотикам, вызываемой C^{2,8}-диметилированием A2503

Рибосома, как уже говорилось выше — древний рибозим, содержащий универсально консервативные структурные элементы, построенные из рибосомной РНК [185], которая в естественных условиях мало подвержена мутациям. Сочетание этой консервативности с критической важностью биологической функции рибосомы сделало её удобной мишенью для множества антибиотиков [186]: около половины клинически употребляемых сегодня антибиотиков тем или иным способом подавляют синтез белка на рибосоме. Эта угроза заставляет болезнетворные микроорганизмы подбирать механизмы устойчивости к антибиотикам, так что число патогенов, устойчивых к антибиотикам, действующим на рибосому, растет год от года [187].

Одним из механизмов, обеспечивающих устойчивость бактериальной рибосомы к действию антибиотика, является ферментативная модификация остатков рРНК, находящихся вблизи сайта связывания антибиотика или непосредственно в сайте связывания. Примером такой модификации может служить метилирование

основания G748, упоминавшееся выше (см. 3.1), или N⁶-метилирование аденина A2058, выполняемое метилтрансферазами семейства Efm [188] и обеспечивающее устойчивость к действию макролидов и кетолидов, или 2⁷-метилирование остатка A1067 метилтрансферазой Tsg, подавляющее действие тиострептона [189] на рибосому производящего этот антибиотик *Streptomyces azureus*. Любопытно, однако, как такая адаптивная модификация нуклеотидных остатков рРНК может влиять на её динамические свойства? Или, ставя вопрос более узко, как адаптивная модификация нуклеотидных остатков, образующих рибосомный туннель, влияет на динамическое поведение последнего?

Неутомимая борьба болезнетворных микроорганизмов с применяемыми против них антибиотиками предоставляет интересный объект для такого исследования — C^{2,8}-диметилирование остатка A2503 23S рРНК, осуществляемое метилтрансферазой Cfr [190], впервые обнаруженной в *S. sciuri* [191] и относящейся к семейству т.н. радикальных SAM-метилтрансфераз ³ [192]. В рибосоме бактерий дикого типа остаток A2503 подвержен конститутивному C²-метилированию, осуществляемому метилтрансферазой RlmN; совместное действие метилтрансфераз RlmN и Cfr приводит к C^{2,8}-диметилированию A2503 и превращению его в m²m⁸A2503. Эта модификация приводит к устойчивости бактерий к антибиотикам разных групп, связывающихся с пептидилтрансферазным центром рибосомы и примыкающей к нему верхней части рибосомного туннеля, а именно, фениколам, линкозамидам, оксазолидинонам, плевомутилинам и некоторым макролидам [193]. Появление у рибосомы столь ярко выраженной множественной лекарственной устойчивости, как правило, объясняют тем, что дополнительная метильная группа в m²m⁸A2503 создает прямые стерические затруднения для связывания того или иного антибиотика со своим сайтом (см., например, [41]). Однако нужно заметить, что пространственная структура рибосомы с диметилированным остатком A2503 неизвестна, а детальный структурный анализ комплексов модифицированной таким образом рибосомы с антибиотиками не проводился.

Интерес к влиянию C^{2,8}-диметилирования A2503 на динамические свойства формирующего рибосомный туннель нуклеотидных остатков усугубляется участием остатка A2503 в согласованном конформационном переходе. Дополнительная C⁸-метильная группа может влиять и на развитие этого процесса.

Разумным было начать это исследование с моделирования комплексов

³SAM — S-аденозил-L-метионин

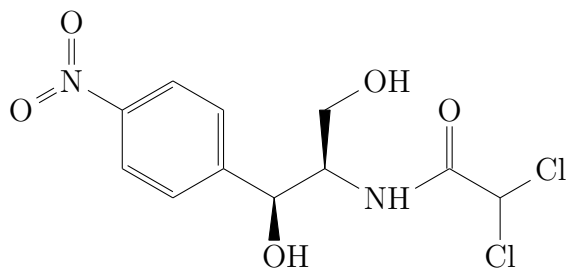


Рис. 3.11. Хлорамфеникол.

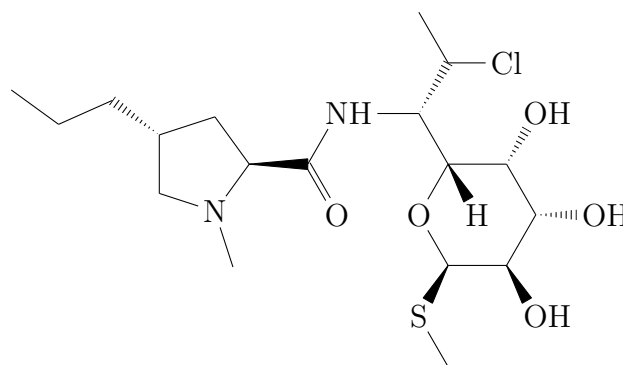


Рис. 3.12. Клиндамицин.

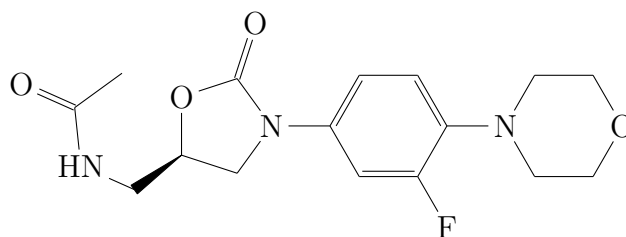


Рис. 3.13. Линезолид.

антибиотиков клиндамицина, линезолида и хлорамфеникола с большой субъединицей рибосомы *E. coli*, содержащей как m^2A2503 , так и остаток m^2m^8A2503 вместо m^2A2503 . Исходные структуры комплексов были построены на основе известных структур комплексов соответствующих антибиотиков с рибосомой, не несущей $C^{2,8}$ -диметилирование остатка $A2503$, полученных методом рентгеноструктурного анализа (см. 4.1). Смысл такого подхода к построению начального состояния моделируемой системы состоит в предположении о том, что это начальное состояние комплекса того или иного антибиотика с рибосомой, несущей m^2m^8A2503 и вследствие этого резистентной к данному антибиотику, будет заведомо нестабильно; следовательно, можно ожидать, что заданное начальное состояние будет разрушаться по мере расчета, в отличие от начального состояния комплекса рибосомы с m^2A2503 . При сравнении этих систем появляется возможность обнаружить именно те изменения в структуре комплекса, которые вызваны дополнительной метильной группой.

3.3.1 Клиндамицин

Клиндамицин относится к семейству антибиотиков линкозамидов, представители которого взаимодействуют одновременно с А-сайтом пептидилтрансферазного центра, куда входит их пролильный фрагмент, и сайтом связывания макролидов, где связывается остаток сахара. У клиндамицина гексозный фрагмент соприкасается с остатками A2058, A2059 и A2503, а пропиловая группа входит в «гидрофобный карман», образуемый основаниями A2451 и C2452 [194; 195]. При моделировании его комплекса с большой субъединицей рибосомы *E. coli* были рассчитаны по одной траектории продолжительностью по 200 нс для систем с основаниями m^2A2503 и m^2m^8A2503 соответственно. Визуальный анализ траекторий показывает, что при $C^{2,8}$ -диметилировании A2503 клиндамицин и его ближайшее окружение существенно более подвижны, чем при C^2 -монометилировании, что свидетельствует о понижении стабильности связывания. Расчет MSD подтверждает это наблюдение: если в системе, несущей m^2A2503 , эта величина совершает резкий скачок между 0 нс и 20 нс и затем почти монотонно понижается, не превышая $0,1 \text{ нм}^2$ и слабо колеблясь, то в системе, несущей m^2m^8A2503 , MSD начинает резко расти с 80 нс, доходя к концу траектории до $0,25 \text{ нм}^2$ и сильно колеблясь. О той же дестабилизации связывания клиндамицина говорит и понижение энергии взаимодействия между клиндамицином и большой субъединицей рибосомы на 30–50 кДж/моль. Её изменения в течение траектории аналогичны таковым для MSD.

При $C^{2,8}$ -диметилировании A2503 меняется и характер водородных связей, образуемых клиндамицином: встречаемости его наиболее стабильных водородных связей в системе с m^2m^8A2503 как бы инвертированы относительно их же встречаемостей в системе с m^2A2503 , причем при диметилировании A2503 водородных связей обнаруживается больше, но их встречаемости меньше (Таб. 3.2), и они нестабильны. В случае же C^2 -монометилированного A2503 при анализе траектории выявляется две основных и очень стабильных водородных связи. Это тоже говорит о дестабилизации связывания клиндамицина, что полностью соответствует экспериментально наблюдаемой устойчивости [190; 196].

Описанную дестабилизацию связывания клиндамицина можно объяснить стерическим затруднением, создаваемым C^8 -метильной группой m^2m^8A2503 для карбонильной группы при C13 и гидроксильной при C5 клиндамицина. Это явление наблюдается визуально и подтверждается тем, что водородная связь амидной группы

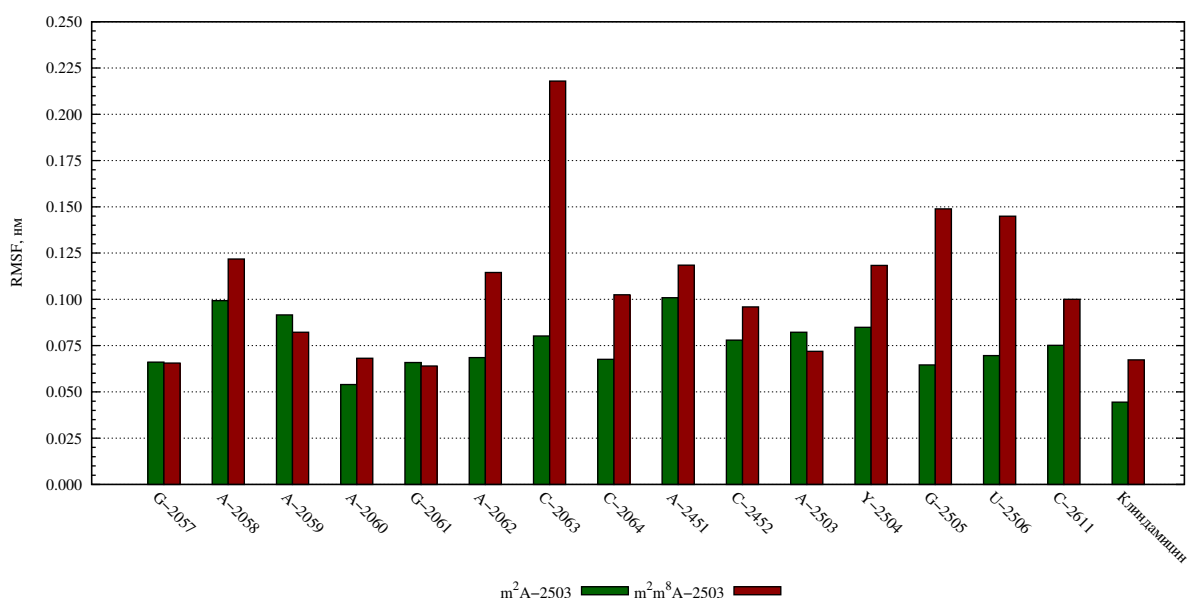


Рис. 3.14. Усредненный по остатку RMSF в сайте связывания клиндамицина. Зеленым показан RMSF для системы с m²A2503, красным — с m²m⁸A2503.

клиндамицина с O4' G2505 ослабляется меньше, чем водородная связь гидроксильной группы при C4 клиндамицина с остатком фосфата G2505: в ходе моделирования клиндамицин придвигается к основанию G2505, но удаляется от его фосфата. Наконец, расстояние между углеродом C⁸-метильной группы m²m⁸A2503 и кислородом при C13 клиндамицина увеличивается с 3,0 Å до 3,6 Å. Это расхождение может иметь ещё и ту сторону, что гидроксильной и карбонильной группам клиндамицина выгоднее образовывать водородные связи с водой или подходящими группами остатков рибосомы, чем находиться в тесном соприкосновении с сугубо гидрофобной C⁸-метильной группой m²m⁸A2503. Поскольку же и m²m⁸A2503 стремится отойти, то он возмущает находящиеся рядом остатки, увеличивая их подвижность и, таким образом, затрудняя образование устойчивых межмолекулярных взаимодействий с клиндамицином. Это увеличение подвижности заметно по RMSF, усредненному по остаткам (Рис. 3.14).

3.3.2 Линезолид

Линезолид относится к семейству оксазолидинонов, недавно разработанных синтетических антибиотиков. Его фенильный фрагмент входит в А-сайт, взаимодействуя с основаниями A2451 и C2452, а ацетамидный фрагмент соприкасается с основанием A2503 [194; 197]. При моделировании комплекса этого антибиотика с большой субъединицей рибосомы *E. coli* были рассчитаны четыре траектории

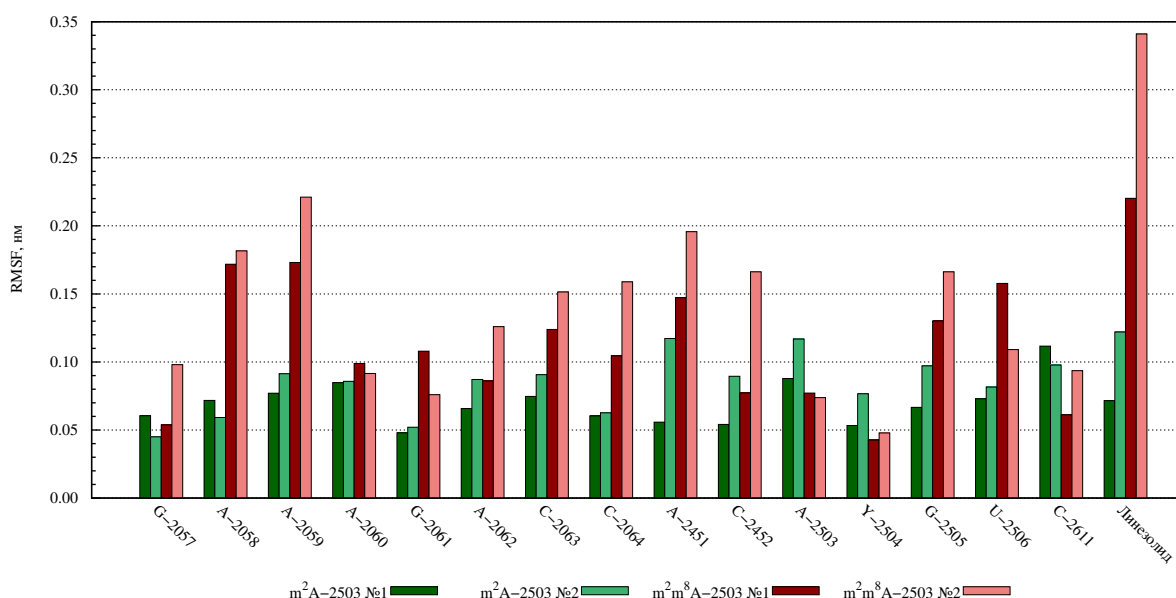


Рис. 3.15. Усредненный по остатку RMSF в сайте связывания линезолида. Зеленым показан RMSF для систем с m²A2503, красным — с m²m⁸A2503.

продолжительностью по 200 нс, две для системы с основанием m²A2503 и две для системы с основанием m²m⁸A2503 соответственно. Их визуальный анализ показывает более острое различие в поведении антибиотика при C^{2,8}-диметилировании A2503 и без оно, чем для клиндамицина: в обеих траекториях системы с m²A2503 линезолид мало движется в своей области связывания и, напротив, полностью уходит оттуда в обеих траекториях системы с m²m⁸A2503. Это наблюдение соответствует величинам MSD линезолида: в обеих траекториях без C^{2,8}-диметилирования A2503 эта величина не превышает 0,1 нм², не возрастая на протяжении траектории, тогда как при C^{2,8}-диметилировании A2503 MSD линезолида растет, достигая 0,6 нм². Наиболее стабильные водородные связи линезолида при C^{2,8}-диметилировании A2503 пропадают вовсе (Таб. 3.2).

Все свидетельствует о разрыве межмолекулярных взаимодействий, удерживающих линезолид в комплексе с большой субъединицей рибосомы. Этот вывод согласуется с литературными данными о устойчивости к линезолиду, вызванной C^{2,8}-диметилированием A2503 [198]. Объяснением дестабилизации связывания линезолида также, как и для клиндамицина, может служить стерическое затруднение, созданное дополнительной метильной группой в m²m⁸A2503. Она мешает ацетильной группе на атоме N20 линезолида занять свое место. Подтверждением модели стерического затруднения может служить то, что антибиотик торезолид, так же относящийся к группе оксазолидинонов, активен против устойчивых к линезолиду

Таблица 3.1. Сохранение комплекса хлорамфеникола с рибосомой при моделировании.

Траектория	Удержание хлорамфеникола в комплексе	
	m ² A2503	m ² m ⁸ A2503
1	Да	Нет
2	Да	Да
3	Нет	Нет
4	Да	Нет

штаммов. При этом торезолид, в отличие от линезолида, несет на атоме C19 гидроксильную группу, а не ацетамидную, что и снимает стерическое затруднение [199]. Впрочем, как и для клиндамицина, для линезолида наблюдается увеличение подвижности нуклеотидных остатков вблизи сайта связывания, что отображается усредненным по остаткам RMSF (Рис. 3.15).

3.3.3 Хлорамфеникол

Хлорамфеникол относится к семейству антибиотиков фениколов, связывающихся в А-сайте большой субъединицы рибосомы, взаимодействуя пара-нитрофенильным фрагментом с основаниями A2451 и C2452 [194; 197]. При моделировании его комплекса с большой субъединицей рибосомы *E. coli* были рассчитаны четыре траектории для системы с основанием m²A2503 и четыре для системы с основанием m²m⁸A2503, каждая протяженностью в 200 нс. Визуальный анализ и расчет MSD показывают менее отчетливые различия в устойчивости связывания хлорамфеникола в случае C²-монометилирования A2503 и в случае его C^{2,8}-диметилирования, чем у других антибиотиков (Таб. 3.1). Меньшая сравнительно с линезолидом и клиндамицином проявленность различий в прочности связывания при моделировании неудивительна, поскольку константа диссоциации комплекса хлорамфеникола с большой субъединицей рибосомы (1500 нМ [200]) на два порядка больше, чем, например, у эритромицина (99 нМ [201]); посредственное удержание хлорамфеникола в его области связывания и побудило нас наложить при моделировании дистанционные ограничения, удерживающие основания A2451 и C2452 в разведенном состоянии, необходимом для связывания. Тем не менее, моделирование воспроизвело дестабилизацию связывания хлорамфеникола при диметилировании A2503 [196].

Таблица 3.2. Наиболее устойчивые водородные связи антибиотиков клиндамицина, линезолида и хлорамфеникола при C²-монометилировании и C^{2,8}-диметилировании А2503.

Антибиотик	Связь		Встречаемость, %	
	Донор	Акцептор	m ² A2503	m ² m ⁸ A2503
Клиндамицин	Cly/N13–H	G-2505/O4'	73	29
	Cly/N19–H	G-2061/O ⁶	5	78
	Cly/O4–H	G-2505/O _{фосфат,1}	88	10
	Cly/O5–H	m ² m ⁸ A-2503/O2'	0	39
	Cly/O5–H	G-2505/O _{фосфат,1}	28	0
	G-2056/N ² –H	Cly/O4	23	0
Линезолид	C-2063/N ⁴ –H	Lzd/O22	0	14
	G-2061/N ² –H	Lzd/O23	0	7
	G-2505/N ² –H	Lzd/O23	0	12
	U-2584/N ³ –H	Lzd/O1	0	7
	Ψ-2504/N ¹ –H	Lzd/O17	40	0
	Ψ-2504/N ¹ –H	Lzd/O23	48	0
	Lzd/N20–H	G-2061/O ⁶	50	4
	Lzd/N20–H	U-2506/O ²	0	9
Хлорамфеникол	A-2451/N ⁶ –H	Clm/O2	0	10
	C-2063/N ⁴ –H	Clm/O4	9	0
	C-2573/N ⁴ –H	Clm/O _{нитрогруппа}	1	11
	Clm/N2–H	G-2505/N ³	0	14
	Clm/N2–H	U-2506/O ²	1	16
	Clm/N2–H	U-2506/O ²	0	16
	Clm/O4–H	C-2063/O ²	9	0
	Clm/O4–H	C-2452/N ³	0	12
	Clm/O5–H	C-2452/N ³	22	1
	Clm/O5–H	C-2452/O ²	7	0
	Clm/O5–H	Ψ-2504/O2'	10	0
	G-2505/N ² –H	Clm/O5	0	19
	U-2506/N ³ –H	Clm/O4	0	8

3.3.4 Системы, не содержащие антибиотиков

Итак, молекулярно-динамическое моделирование отобразило экспериментально наблюдаемую устойчивость рибосомы к клиндамицину, линезолиду и хлорамфениколу, вызываемую $C^{2,8}$ -диметилированием A2503. Что же именно приводит к уменьшению сродства большой субъединицы бактериальной рибосомы к антибиотикам? Очевидное объяснение, предлагаемое в [202], состоит в том, что C^8 -метильная группа остатка m^2m^8A2503 создает пространственное затруднение для антибиотика и этим затрудняет его связывание. Оно хорошо подходит для антибиотиков, связывающихся близко от m^2A2503 , например, клиндамицина, однако и для хлорамфеникола, не соприкасающегося непосредственно с нуклеотидным остатком A2503, наблюдается устойчивость. При этом для всех трех исследуемых антибиотиков наблюдается увеличение подвижности нуклеотидных остатков в области их связывания. Следовательно, можно предположить, что существует некий общий для смоделированных антибиотиков способ затруднения их связывания с рибосомой, не основанный на простом пространственном затруднении, вызываемом дополнительной метильной группой в m^2m^8A2503 , но связанный с изменениями в динамическом поведении нуклеотидных остатков рибосомного туннеля, вызываемыми адаптивной модификацией остатка A2503. Например, введение C^8 -метильной группы в основание m^2A2503 может ослаблять стэкинг-взаимодействия между ним и его соседями — остатками A2059 и G2061, отчего весь ассоциат A2058–A2059– m^2m^8A2503 –G2061–C2063 становится менее прочен и более подвижен.

Для проверки этих предположений были рассчитаны 14 траекторий системы с введенным m^2m^8A2503 , протяженностью от 160 нс до 400 нс и четыре траектории системы с немодифицированным A2503 продолжительностью от 280 нс до 400 нс. В ходе анализа они сравнивались с траекториями системы «дикого типа», несущей остаток m^2A2503 , полученными ранее (см. 3.2). В части вновь полученных траекторий наблюдались события, являющиеся частями описанного в 3.2 конформационного перехода; такие траектории пока исключим из рассмотрения.

Поскольку предполагается, что искомый механизм понижения сродства связан с изменением подвижности нуклеотидных остатков рибосомного туннеля, то анализ выбранных траекторий разумно начать с расчета усредненного по остатку RMSF для области, содержащей все остатки, отстоящие от сайта связывания макролидов не более чем на 12Å. Эта величина одновременно падает или растет и для

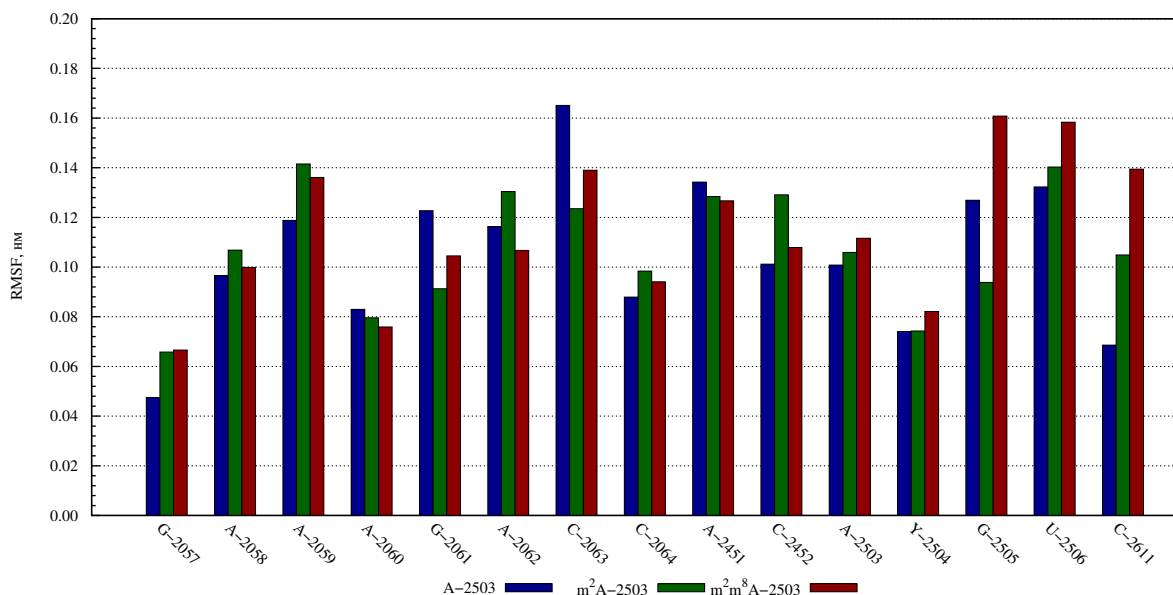


Рис. 3.16. Усредненный по остатку RMSF в исследуемой области. Зеленым показан RMSF для систем с m²A2503, красным — с m²m⁸A2503, синим — с немодифицированным A2503.

системы с немодифицированным A2503, и для системы с m²m⁸A2503 относительно системы с m²A2503 (Рис. 3.16). Эти изменения согласуются с изменениями в подвижности остатков, наблюдавшихся для систем с антибиотиками. Обусловлены ли они ослаблением стэкинг-взаимодействий гетероциклического основания A2503 с основаниями соседних остатков A2059 и G2061, как предполагалось выше? Нет — расчет энергий нековалентных взаимодействий между гетероциклическими основаниями показывает, что, 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 C²-монометилирования A2503. Следовательно, это предположение отпадает.

Между тем, в работе [41] указывают, что C²-метильная группа в m²A2503 стабилизирует его взаимодействие с A2059. Можно ожидать, что C⁸-метильная группа будет упрочать взаимодействие m²m⁸A2503 с G2061 схожим образом. Однако, если m²m⁸A2503 и его соседи будут иметь ту же конформацию, что и в структуре с m²A2503, то C⁸-метильная группа не будет соприкасаться с гидрофобной поверхностью основания G2061 и будет окружена водой. Чтобы она ушла из полярного окружения и образовала обсуждаемый гидрофобный контакт, основания в триаде A2059-m²m⁸A2503-G2061 должны будут повернуться так, чтобы C⁸-метильная группа направилась к пептидилтрансферазному центру (к остатку G2061), а C²-метильная группа — к выходу из туннеля (к остатку A2059). Это

изменение конформаций распространится в обе стороны от m^2m^8A2503 , приводя к тому, что основания в области связывания исследуемых антибиотиков удалятся от конформации, оптимальной для взаимодействия с ними, да и просто станут более подвижны.

Для проверки этой идеи была проведена оценка изменения ориентации плоскостей оснований в пространстве в траектории с помощью специально написанной программы (см. 4.3), с m^2A2503 или m^2m^8A2503 в качестве базисных оснований и C^6 и N^3 модифицированного аденина в качестве реперной пары. Оказалось, что распределение угла A остатка $A2503$ содержит двоянный пик между 10 и 40 градусами при C^2 -монометилировании $A2503$; при $C^{2,8}$ -диметилировании $A2503$ этот двоянный пик смещается в сторону больших углов. Изменяются и распределения и других углов и у остатков $A2059$ и $G2061$. Распределения ориентационных углов при немодифицированном $A2503$ существенно отличаются от таковых при m^2A2503 и ближе к таковым при m^2m^8A2503 (Рис. 3.17). Схожие изменения пространственных ориентаций плоскостей гетероциклических оснований наблюдаются и для систем, содержащих антибиотики (Рис. 3.18), хотя эти изменения и менее отчетливы, что объясняется тем, что антибиотики будут стабилизировать конформации оснований, существующие при C^2 -монометилировании $A2503$ и выгодные для связывания. Это связано с выбранным способом задания начального состояния систем с антибиотиками, при котором конформации нуклеотидных остатков и положения антибиотика совпадают для систем с C^2 -монометилированным и с $C^{2,8}$ -диметилированным $A2503$.

Что служит причиной тяготению гетероциклических оснований $A2059$, $A2503$ и $G2061$ к повороту относительно условной оси рибосомного туннеля при $C^{2,8}$ -диметилировании $A2503$? Анализ стэкинг-взаимодействий показывает, что в стопке оснований $G2056$ – $G2061$ при $C^{2,8}$ -диметилировании $A2503$ усиливаются взаимодействия между основаниями $G2057$, $A2058$, $A2059$ и $A2503$, но ослабевает взаимодействие между основаниями $A2503$ и $G2061$ (Рис. 3.19), причем в траекториях с немодифицированным $A2503$ наблюдается полный выход основания $A2503$ из стопки $G2056$ – $G2061$ с образованием стэкинга между основаниями $A2059$ и $G2061$. Результаты анализа стэкинг-взаимодействий подтверждаются расчетом энергий (Рис. 3.22). Пик в распределении энергии взаимодействия оснований $A2059$ – $A2503$, отвечающий наивысшим энергиям (то есть стэкингу), смещается в сторону более отрицательных значений для системы с $C^{2,8}$ -диметилированием $A2503$. При этом увеличиваются такие же пики для всех пар оснований в стопке $G2057$ – $A2503$, а пики при меньших энергиях

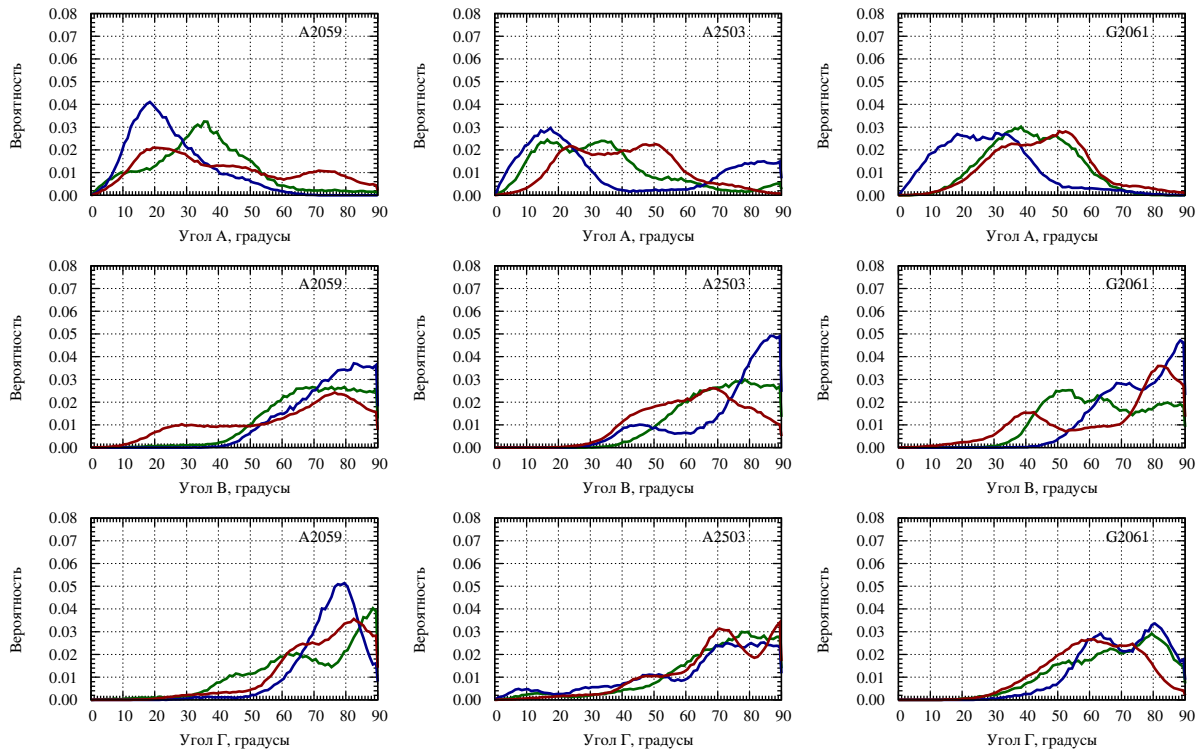


Рис. 3.17. Распределения ориентационных углов для систем, не содержащих антибиотиков. Зеленым показаны распределения для систем с m^2A2503 , красным — с m^2m^8A2503 , синим — с немодифицированным A2503.

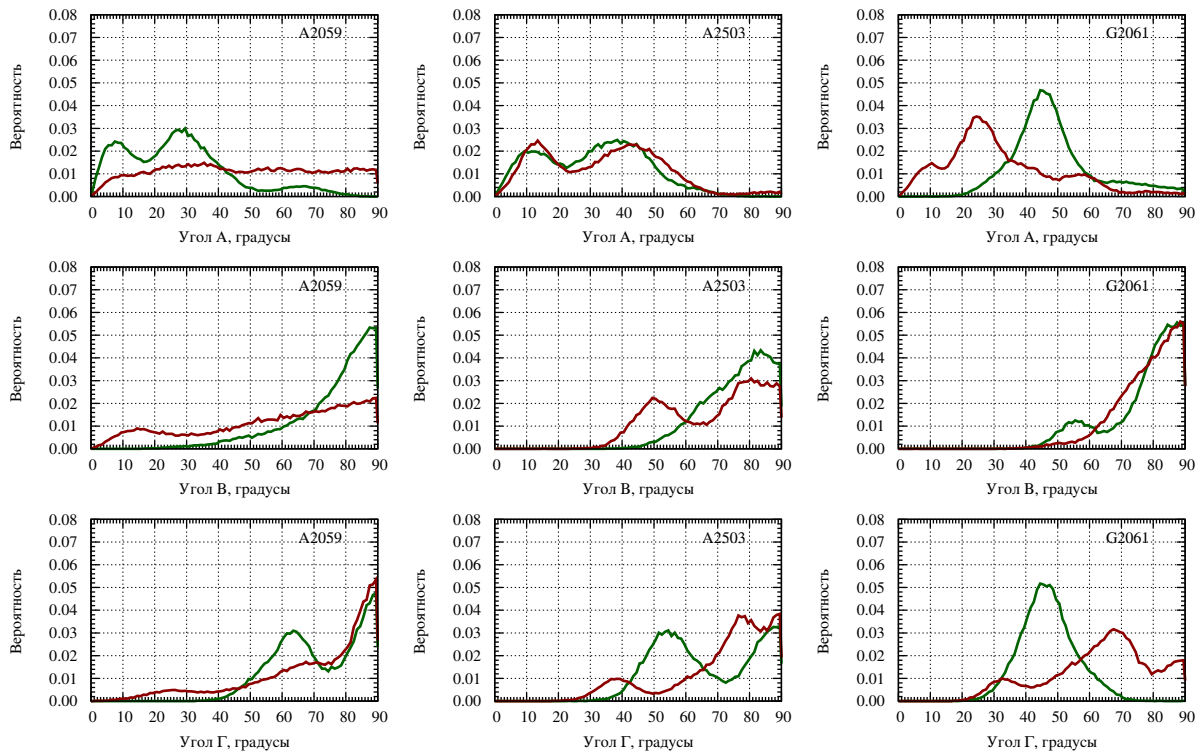


Рис. 3.18. Распределения ориентационных углов для систем, не содержащих антибиотиков. Зеленым показаны распределения для систем с m^2A2503 , красным — с m^2m^8A2503 .

взаимодействия сокращаются. Но при этом для оснований G2061 и A2503 в системах с m^2m^8A2503 увеличиваются пики, отвечающие гидрофобному контакту (~ -15

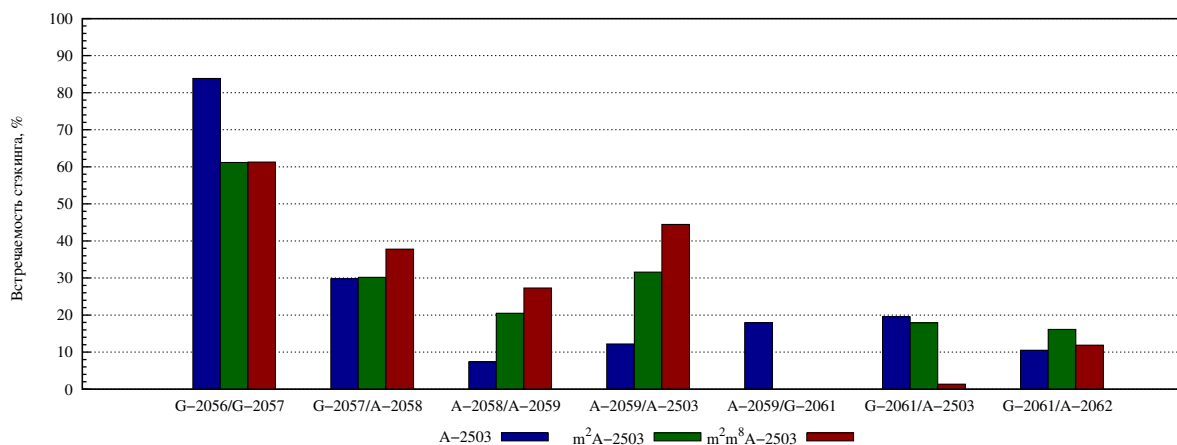


Рис. 3.19. Частота встречаемости стэкинг-взаимодействий в окружении остатка A2503. Зеленым показана частота для систем с m²A2503, красным — с m²m⁸A2503, синим — с немодифицированным A2503.

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 C^{2,8}-диметилировании 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. 3.20). 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. 3.21).

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 C⁸-метильной группы в C²-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 C⁸-метильной группы m²m⁸A2503 из водного окружения к гидрофобной плоскости основания G2061.

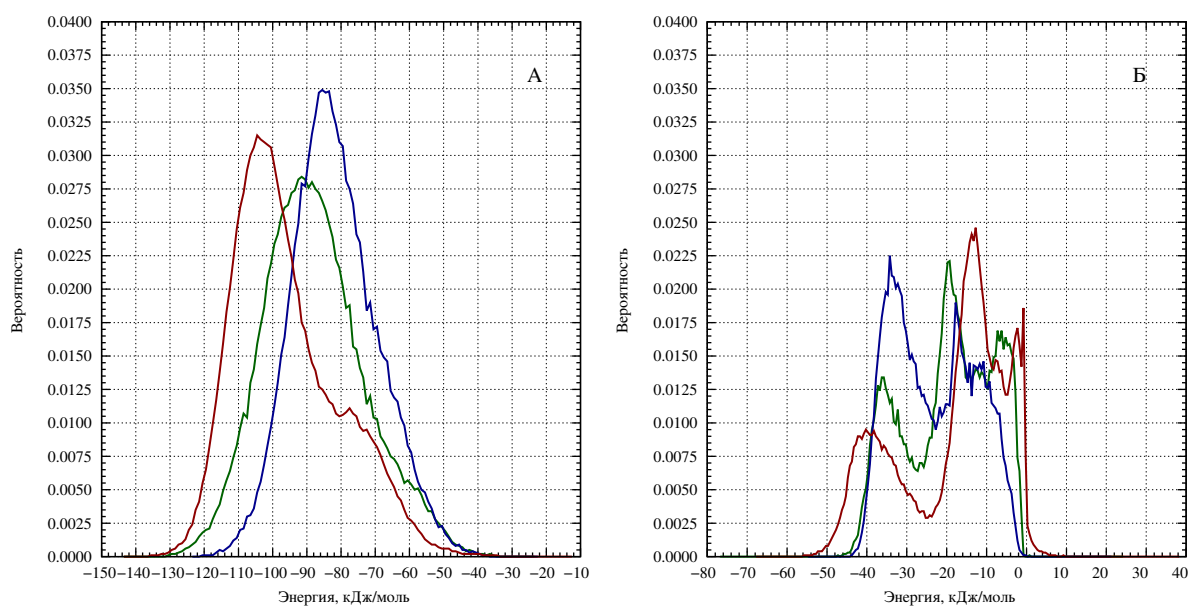


Рис. 3.20. Распределения суммарной энергии взаимодействий оснований G2056–A2503 (А) и энергии взаимодействия оснований A2503–G2061 (Б). Зеленым показаны распределения для систем с m^2A2503 , красным — с m^2m^8A2503 , синим — с немодифицированным A2503.

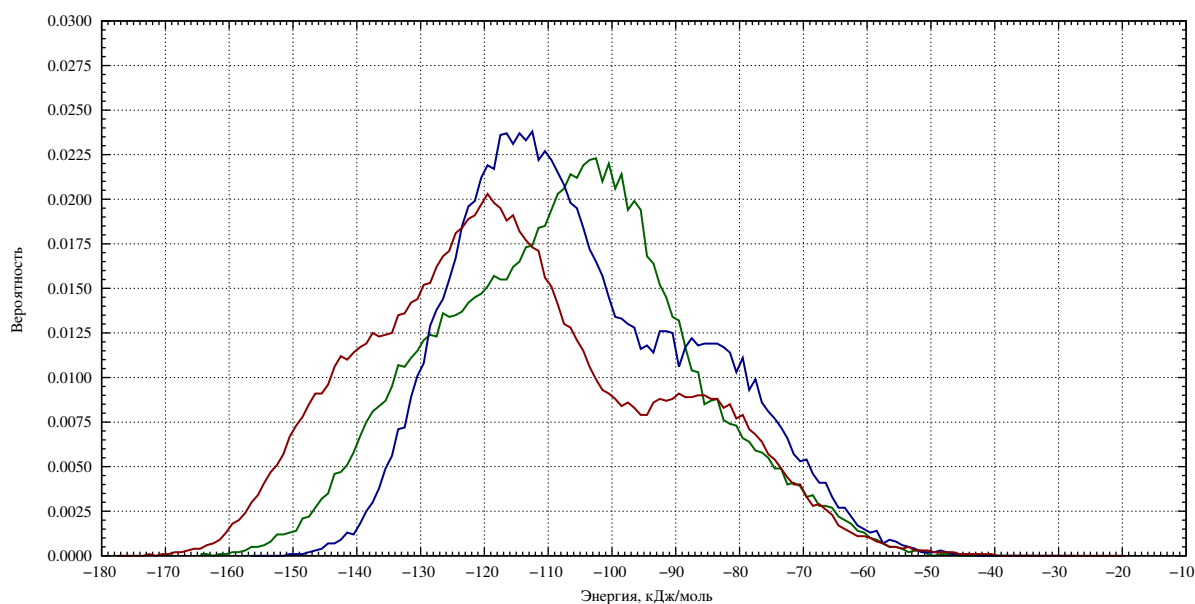


Рис. 3.21. Распределение суммарной энергии взаимодействий оснований G2056–G2061. Зеленым показаны распределения для систем с m^2A2503 , красным — с m^2m^8A2503 .

В целом, 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 $C^{2,8}$ -диметилированием A2503 выгоднее положения, обычного для системы с C^2 -метилированием A2503 приблизительно на 17 кДж/моль.

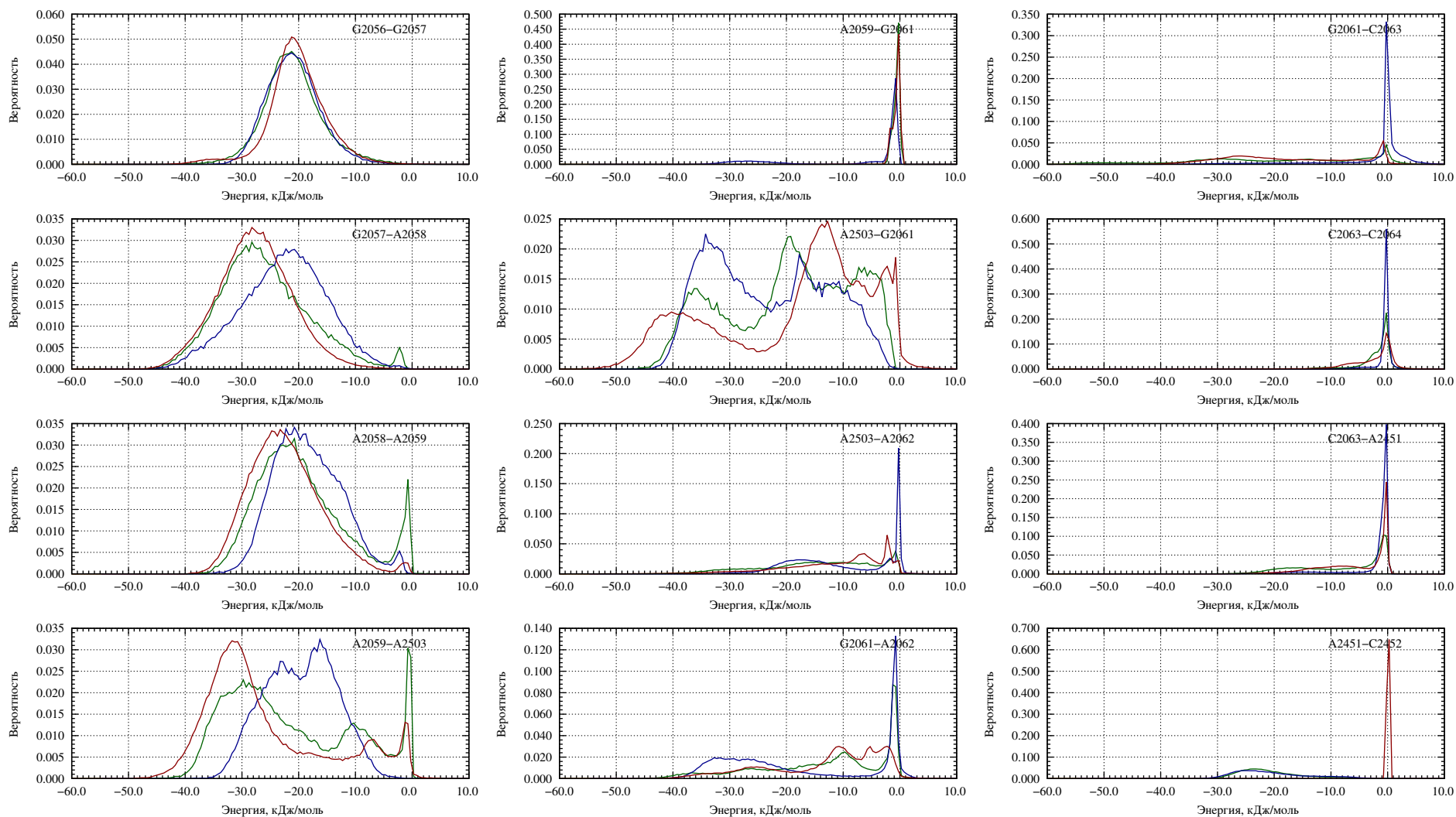


Рис. 3.22. Распределения энергий взаимодействий гетероциклических оснований в исследуемом сегменте рибосомного туннеля. Зеленым показаны распределения для систем с m^2 A2503, красным — с m^2m^8 A2503, синим — с немодифицированным A2503.

Уже этих изменений достаточно, чтобы затруднить связывание линкозамидов и оксазолидинонов, поскольку представители этих классов антибиотиков непосредственно соприкасаются с A2058, A2059, A2503 и G2061 при связывании. Но возмущение структуры рибосомы, создаваемое m^2m^8A2503 , имеет и более общие и далекодействующие последствия. Вспомним, что водородные связи отвечают за поддержание пространственной структуры биополимеров вообще и нуклеиновых кислот — в особенности. Кроме того, 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 или отсутствии его модификации они ослабевают (Таб. 3.3). Поэтому можно утверждать, что изменение положения оснований A2059, A2503 и G2061 будет приводить к изменению конформаций остатков рРНК в рибосомном туннеле и, следовательно, к понижению сродства рибосомного туннеля к антибиотикам, в том числе, и тем, которые не соприкасаются прямо с A2503 и его ближайшим окружением.

Таблица 3.3. Частота встречаемости наиболее устойчивых водородных связей.

Связь		Встречаемость, %		
Донор	Акцептор	A2503	m^2A2503	m^2m^8A2503
A-2014/O2'-H	A-2015/O5'	86	61	73
A-2054/N ⁶ -H	A-2577/N ¹	45	67	29
A-2450/N ⁶ -H	C-2501/N ³	30	70	13
A-2577/N ⁶ -H	A-2054/N ⁷	68	83	35
A-750/N ⁶ -H	m^1G-745/N^3	51	84	35
A-750/O ^{2'} -H	A-752/O _{фосфат,1}	52	69	42
A-753/N ⁶ -H	U-744/O ⁴	67	91	45
C-2501/N ⁴ -H	A-2450/N ⁷	34	68	18
C-2501/O2'-H	G-2502/O _{фосфат,2}	44	58	19

Таблица 3.3. Частота встречаемости наиболее устойчивых водородных связей.

Связь		Встречаемость, %		
Донор	Акцептор	A2503	m ² A2503	m ² m ⁸ A2503
C-2507/N ⁴ -H	G-2582/O ⁶	69	97	26
G-2056/N ¹ -H	C-2612/N ³	97	74	83
G-2056/N ² -H	C-2612/O ²	62	66	39
G-2446/N ¹ -H	C-2064/N ³	52	62	57
G-2446/N ² -H	C-2064/O ²	9	60	31
G-2447/O2'-H	U-2500/O _{фосфат,2}	33	87	51
G-2505/O2'-H	U-2506/O5'	5	60	42
G-2576/N ² -H	U-2506/O _{фосфат,2}	10	75	21
G-2581/N ² -H	C-2610/O2'	37	68	26
G-2581/N ² -H	G-2581/O _{фосфат,2}	68	68	32
G-2582/N ¹ -H	C-2507/N ³	97	97	65
G-2582/N ² -H	C-2507/O ²	69	99	27
G-748/N ² -H	Ψ-746/O4'	30	54	25
G-748/O2'-H	A-750/N ⁷	78	56	65
m ¹ G-745/N ² -H	A-750/N ¹	48	78	30
m ¹ G-745/O2'-H	A-750/N ⁶	58	73	69
m ⁵ U-747/N ³ -H	A-2014/N ³	98	86	91
U-2500/O2'-H	Ψ-2504/O _{фосфат,2}	57	66	0
U-2609/N ³ -H	A-752/N ¹	25	53	28
U-744/N ³ -H	A-753/N ¹	98	97	97
Ψ-2504/N ³ -H	U-2500/O ²	33	66	41
Ψ-2580/N ³ -H	G-2508/O ⁶	38	55	45

Обсудим ещё одну сторону поведения сети водородных связей в случае C^{2,8}-диметилирования A2503. Предположим, что все водородные связи, найденные при анализе траекторий выбранной системы, могут существовать в ансамбле рибосом, а вычисленная по траекториям встречаемость каждой из этих связей есть оценка вероятности её существования в выбранный момент времени. Вероятность же существования водородной связи будем рассматривать как оценку стабильности

этой связи (очевидно, что чем выше вероятность, тем выше стабильность связи), или как оценку вклада этой связи в общую энергетику сети водородных связей, так что каждая связь создает некий энергетический выигрыш, но тем меньший, чем меньше вероятность её существования. С этими посылками мы можем построить граф водородных связей, удерживающих структуру рибосомы, для обозначенной в 3.3.4 области и, используя алгоритм Флойда-Уоршела [203], проложить в нем пути от остатков A2059, A2503 и G2061 к остаткам пептидилтрансферазного центра, таким, как A2451 и C2452 (которые важны для связывания хлорамфеникола). Если такой путь найден, то можно полагать, что между соседями A2503 и A2451 или C2452 имеется некая связность. Чем выше стабильность каждой из связей (ребер графа) в этом пути, тем выше сила этой связности. В качестве оценки возьмем вероятность одновременного существования всех связей в составе пути $P_{\text{путь}}$, которая равна

$$P_{\text{путь}} = \prod_i^N P_{\text{связь},i} \quad (3.1)$$

причем, если два остатка связаны несколькими связями, то в качестве $P_{\text{связь},i}$ выбирается вероятность наистабильнейшей связи. Чем выше $P_{\text{путь}}$, тем сильнее связность. Результаты таких расчетов показывают, что при C^{2,8}-диметилировании A2503 как уменьшается количество путей, связывающих пептидилтрансферазный центр и соседей A2503, так и понижается их устойчивость (Таб. 3.4). Это так же может объяснить, почему m²m⁸A2503 вызывает устойчивость рибосомы к хлорамфениколу: ослабление связности приводит к изменению распределения конформаций A2451 и C2452, критически важных для связывания хлорамфеникола ⁴.

Таким образом, на основании результатов проведенного молекулярно-динамического моделирования можно предложить такой механизм возникновения устойчивости бактериальной рибосомы к оксазолидинонам, линкозамидам и амфениколам, вызываемой C^{2,8}-диметилированием гетероциклического основания A2503: введение C⁸-метильной группы приводит к упрочению стэкинг-взаимодействий между основаниями A2503 и A2059, которое требует поворота этих оснований. Этот поворот приводит, с одной стороны, к схлопыванию оснований A2058 и A2059 с образованием сплошной стопки оснований G2056–G2057–A2058–A2059–m²m⁸A2503, что обеспечивает энергетический

⁴Эти основания образуют «гидрофобный карман», в который входит нитрофенильная группа хлорамфеникола. Для связывания хлорамфеникола необходимо, чтобы эти основания были разведены; если отчего-то равновесие между «разведенной» и «схлопнувшейся» конформациями сместится в сторону вторых, то сродство рибосомы к хлорамфениколу упадет.

Таблица 3.4. Связность остатков сайта связывания макролидов и пептидилтрансферазного центра.

Система	Путь связности	Вероятность, %
Пустая, m ² A2503	G2061–C2501–A2450–A2451	1,7244
	G2061–G2446–G2447–U2500– A2453–C2452	0,4851
Пустая, m ² m ⁸ A2503	G2061–C2501–A2450–G2447– U2500–Ψ2504–C2452	0,1569
Пустая, A2503	G2061–A2451	14,4712
	G2061–A2451–G2447–A2450– C2452	0,1818

выигрыш, с другой стороны, разрушает стэкинг-взаимодействие A2503 с G2061, потеря которого частично компенсируется уходом C⁸-метильной группы m²m⁸A2503 из полярного окружения к гидрофобной поверхности основания G2061. Это изменение конформаций нескольких остатков как само по себе препятствует связыванию непосредственно соприкасающихся с ними антибиотиков, так и понижает сродство рибосомы к ним, возмущая сеть водородных связей, удерживающую пространственную структуру рРНК, что приводит к изменению конформаций тех оснований, которые удалены от A2503.

3.3.5 Эритромицин

Эритромицин относится к семейству 14-членных макролидов, связывающихся в рибосомном туннеле, образуя водородную связь между своим аминсахаром и основанием A2058 и гидрофобный контакт с основаниями A2058 и C2611 [25; 68]. Нет сведений о том, что C^{2,8}-диметилирование A2503 вызывает устойчивость к эритромицину, однако известно, что такая адаптивная модификация m²A2503 вызывает устойчивость к 16-членным макролидам [193]. Учитывая последнее и предложенный выше общий механизм устойчивости к антибиотикам, вызываемой C^{2,8}-диметилированием A2503, можно ожидать, что и для эритромицина при моделировании будут наблюдаться те же явления, что и для клиндамицина, линезолида и хлорамфеникола.

Чтобы проверить это предположение, для комплекса эритромицина с большой

Таблица 3.5. Наиболее устойчивые водородные связи эритромицина.

Связь		Встречаемость, %	
Донор	Акцептор	m ² A2503	m ² m ⁸ A2503
Arg-92 _{L22} /N ^{η1} -H	Лактон/O12	0	8
Дезозамин/O2'-H	A-2058/N ¹	60	43
Lys-90 _{L22} /N ^ζ -H	Лактон/O1	0	20
Lys-90 _{L22} /N ^ζ -H	Лактон/O12	20	16

субъединицей рибосомы *E. coli* были рассчитаны две траектории системы с основанием m²A2503 продолжительностью от 210 нс до 545 нс и две траектории системы с основанием m²m⁸A2503 продолжительностью по 320 нс каждая. Визуальный анализ полученных траекторий показывает, что при введении m²m⁸A2503 вместо m²A2503 эритромицин смещается со своего места, что сопровождается понижением стабильности характерной для макролидов водородной связи 2'-гидроксильной группы аминоксахара с N¹ A2058. При этом две устойчивых водородных связи в случае C²-мометилирования A2503 заменяются четырьмя менее устойчивыми водородными связями в случае C^{2,8}-диметилирования A2503, две из которых в первом случае отсутствуют (Таб. 3.5). Таким образом, для эритромицина наблюдаются явления, подобные наблюдавшимся для других смоделированных антибиотиков, чувствительных к C^{2,8}-диметилированию A2503. Это позволяет предполагать, что C^{2,8}-диметилирование A2503 должно вызывать устойчивость бактериальной рибосомы и к эритромицину.

3.3.6 Заключение

Итак, пример адаптивного C⁸-метилирования остатка m²A2503 показывает, что модификация гетероциклических оснований, слагающих рибосомный туннель, может оказывать существенное влияние на динамическое поведение последнего. Это влияние основывается на перераспределении электронной плотности в гетероциклическом основании, приводящем к изменению геометрических характеристик образуемых им стэкинг-взаимодействий и, следовательно, перестройке этих взаимодействий, распространяющейся по стопке, в которую входит модифицируемое основание. Эти

перестройки, в свою очередь, могут распространиться дальше за счет влияния на сеть межмолекулярных взаимодействий (водородных связей, стэкинг-взаимодействий и т.п.), удерживающих пространственную структуру рибосомы. Кроме того, если адаптивная модификация подавляет образование водородной связи, участвующей в поддержании пространственной структуры биополимера, то она также может послужить причиной таких перестроек. Отметим главное следствие приведенного выше исследования: введение адаптивной модификации нуклеотидного остатка или исчезновение его конститутивной модификации может производить на пространственную структуру рибосомы нелокальное действие, опосредуемое сетью нековалентных взаимодействий между составляющими её остатками. Это действие может быть исследовано методами молекулярной динамики.

3.4 Изучение связывания альдегидных производных эритромицина

По результатам исследования тилозина в нашей лаборатории возникла идея о такой модификации эритромицина А (далее просто эритромицина), которая позволила бы ему образовывать, подобно тилозину [159; 204], ковалентную связь с одним из нуклеотидных оснований стенок рибосомного туннеля, должно было бы приводить к более прочному связыванию такого соединения с рибосомой.

Воплощение этой идеи началось с того, что анализом данных РСА для комплекса эритромицина с рибосомой *E. coli* [195] и статическим моделированием на их основе были определены два наиболее обещающих положения в структуре эритромицина для введения заместителя, содержащего альдегидную группу: 6-О и 3-N', так что введенные заместители должны были бы реагировать с экзоциклическими аминогруппами нуклеотидных остатков А2062 и А2059 соответственно. Поскольку в первом случае требовалось введение длинного, 3-оксопропильного или даже 4-оксобутильного заместителя, способного сильно нарушить связывание эритромицина в его сайте, было принято решение о модификации эритромицина по положению 3-N'. В этом случае замена одной из метильных групп на 3-N' остатка десмикозина на 2-оксоэтильную или 3-оксопропильную позволяет их карбонильным атомам углерода сблизиться с азотом экзоциклической аминогруппы А2059 на расстояние, с учетом подвижности остатков 23S рРНК достаточное для образования ковалентной связи (Рис. 3.23).

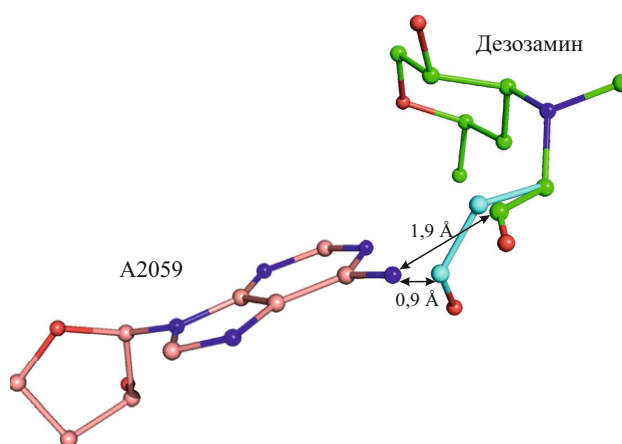


Рис. 3.23. Статическое моделирование предполагаемых конформаций 2-оксоэтильной (зеленой) и 3-оксопропильной (голубой) групп, введенных в 3-N'-дезметилэритромицин А.

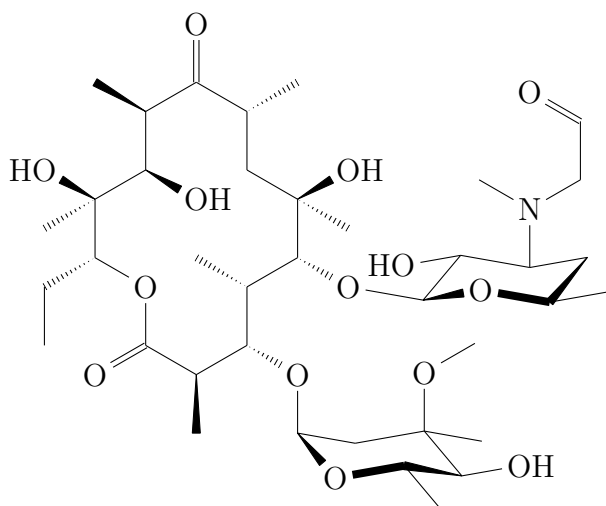


Рис. 3.24. Производное I.

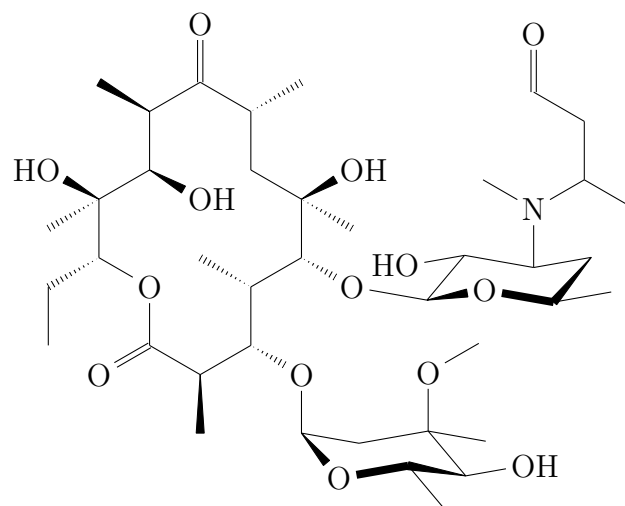


Рис. 3.25. Производное II.

Исходя из этих соображений 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 методом вытеснения флуоресцентно-меченого эритромицина были определены константы диссоциации их комплексов с рибосомами *E. coli* и определена способность подавлять синтез люциферазы *Renilla luciferase in vitro* (Таб. 3.6). Константа диссоциации для обоих альдегидных производных оказалась выше, чем для эритромицина, что говорит об отсутствии ковалентного связывания, 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*.

Структуры соединений **I** и **II** устанавливались в рибосомном туннеле наложением на эритромицин (см. 4.1). 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. По рассчитанным траекториям анализировались водородные связи (см. 4.3) и рассчитывались энергии нековалентных взаимодействий производного эритромицина с остатками стенок рибосомного туннеля.

Анализ водородных связей (Таб. 3.7) показывает, что у обоих альдегидных производных эритромицина А понижается стабильность характерной для макролидов водородной связи между 2'-гидроксильной группой остатка аминасахара и N1 A2058, причем у **II** больше, чем у **I**, и ослабляется устойчивость водородной связи между Lys-90 белка L22 и лактонным кольцом. С другой стороны, эта просадка восполняется у соединения **I** образованием экзоциклической аминогруппой A2058 водородной связи с 2'-гидроксильным кислородом остатка аминасахара и, что

Таблица 3.6. Константы диссоциации и ингибирующая способность альдегидных производных эритромицина А.

Соединение	Константа диссоциации, нМ	Подавление трансляции, %
Эритромицин А	$3,5 \pm 0,9$	3
I	280 ± 60	62
II	$8,1 \pm 1,2$	6

Таблица 3.7. Встречаемость водородных связей альдегидных производных эритромицина А.

Водородная связь		Встречаемость, %		
Донор	Акцептор	Эритромицин А	I	II
A-2058/N6-H	Дезозамин/O2'	0	61	0
A-2059/N6-H	Дезозамин/O _{карбонил}	0	84	0
Кладиноза/O4''-H	C-2610/O4'	0	0	62
Дезозамин/O2'-H	A-2058/N1	60	22	4
Дезозамин/O2'-H	G-2057/O6	0	0	76
G-2505/N1-H	Дезозамин/O2'	0	6	0
Lys-90 _{L22} /N ^ε -H	Лактон/O12	20	8	0

наиболее интересно, появлением водородной связи между карбонильным кислородом 2-оксоэтильного фрагмента и экзоциклической аминогруппой A2059. У соединения **II** 2'-гидроксильная группа остатка дезозамина образует стойкую водородную связь с нуклеотидным остатком G2057, а 4''-гидроксильная группа остатка кладинозы — устойчивую водородную связь с нуклеотидным остатком C2610. 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) (Рис. 3.26). Это, вместе с данными о устойчивости водородных связей, 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 нуклеотидных остатков G2056, G2057 и G2505 (Рис. 3.27). 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, помимо водородных связей и гидрофобных контактов, ещё одно 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.

Результаты моделирования объясняют и то, почему введенный в дезозамин соединения **I** 2-оксоэтильный заместитель не взаимодействует с экзоциклической аминогруппой нуклеотидного остатка A2059 с образованием ковалентной связи, как то предполагалось: это взаимодействие подразумевает нуклеофильную атаку карбонильного углерода неподделенной парой экзоциклической аминогруппы, что требует нахождения плоской карбонильной группы «под» или «над» атакующей аминогруппой. Образование же водородной связи между карбонильной группой дезозамина и аминогруппой A2059 радикально затрудняет достижение ими необходимого для химической реакции взаимного расположения.

Падение стабильности связывания соединения **I** относительно эритромицина можно объяснить тем, что новая водородная связь, образуемая карбонильной группой 2-оксоэтильного заместителя смещает лактонное кольцо из «гидрофобного кармана» сайта связывания, не восполняя при этом потерянные гидрофобные контакты. Соединение **II**, в свою очередь, восполняет эту потерю выигрывшем за счет координации иона магния. Впрочем, как следует из величин RMSF (Рис. 3.28), эта координация приводит к увеличению подвижности лактонного кольца и остатка кладинозы, что свидетельствует о нарушении их взаимодействия с сайтом связывания макролидов. Возможно, поэтому соединение **II** не превосходит эритромицин по средству к рибосоме, несмотря на более высокую энергию взаимодействия с ней.

Совместная координация иона магния альдегидным производным эритромицина и остатками 23S рРНК, образующими стенки рибосомного туннеля, интересна не

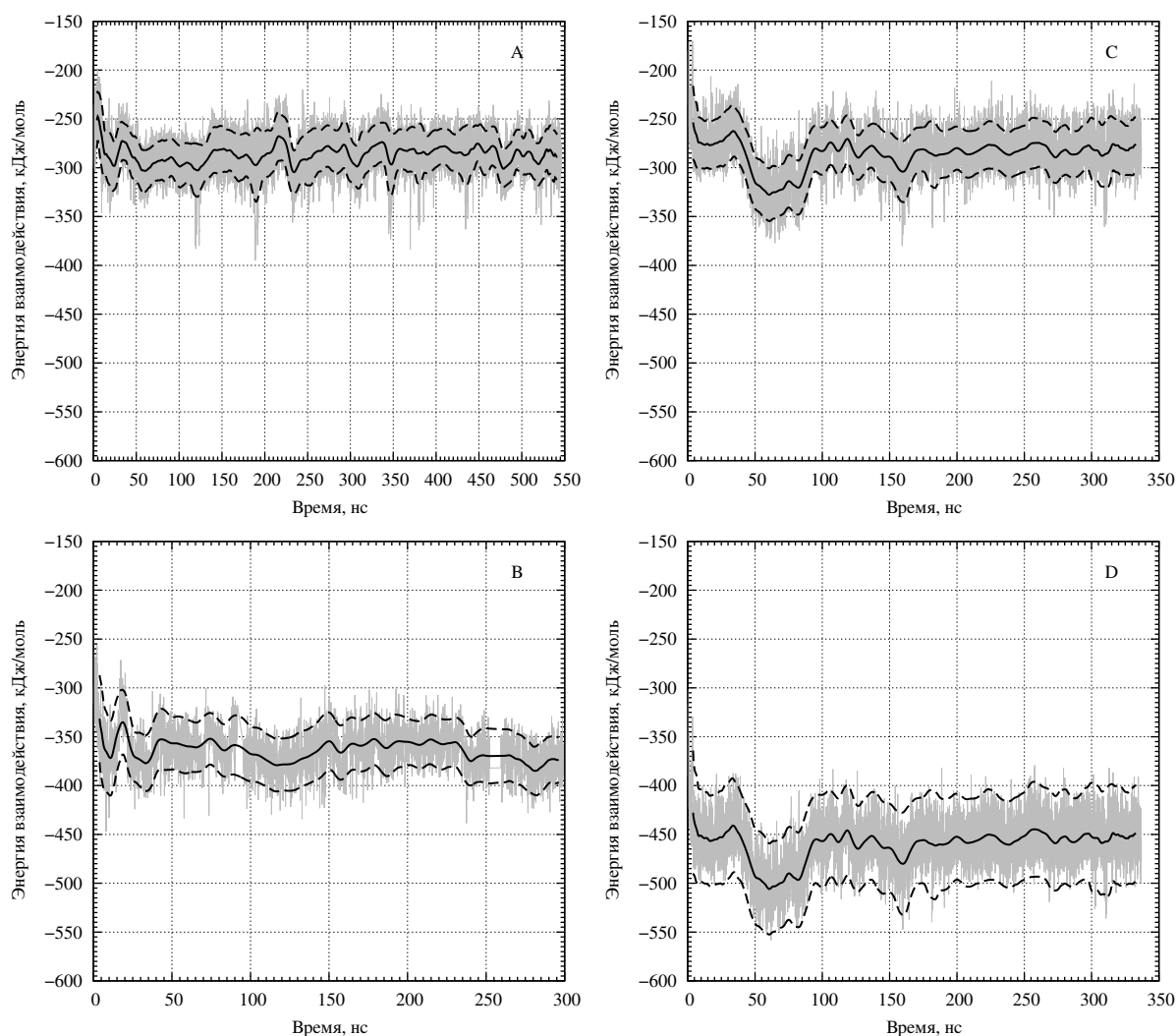


Рис. 3.26. Энергии нековалентных взаимодействий производных эритромицина с рибосомой. Серым показаны значения энергии невалентных взаимодействий, черной сплошной линией — значения энергии, сглаженные скользящим средним с окном 8 нс, черной пунктирной линией — скользящее стандартное отклонение. А: Эритромицина. В: Соединения I. С: Соединения II. D: Соединения II в сумме с энергией взаимодействия карбонильного кислорода с ионом магния, координированного фосфатными группами нуклеотидных остатков G2056, G2057 и G2505.

только как объяснение отдельного экспериментального факта. Она указывает на два важных соображения общего свойства.

Первое соображение непосредственно вытекает из объяснения прочности связывания совместной координацией иона и касается роли ионов в связывании низкомолекулярных лигандов. Само это участие иона в связывании малой молекулы высвечивает серьезное отличие РНК, уложенных в третичную структуру, от белков; если последние координируют небольшое количество ионов на поверхности, представляясь чем-то подобным неполярной капле в полярном окружении, то РНК, обладающие третичной структурой, сильно сольватированы и непременно

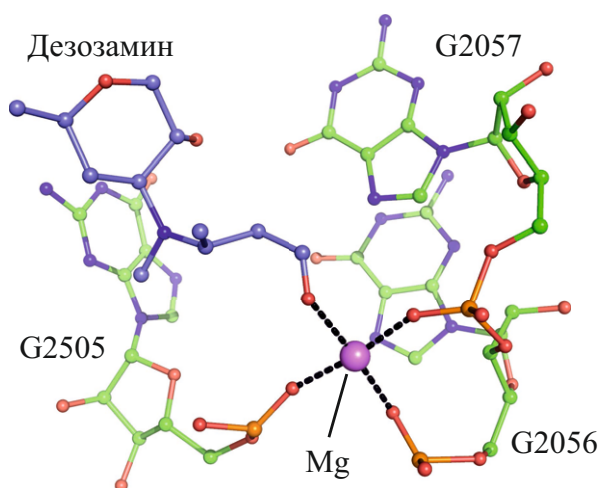


Рис. 3.27. Совместная координация иона магния карбонильной группой 1-метил-3-оксopропильного фрагмента соединения **II** и фосфатными группами нуклеотидных остатков G2056, G2057 и G2505. Показан только остаток 3'-N-(1-метил-3-оксopропил)-3'-N-дезметилдезозамина.

координируют ионы магния, необходимые им для поддержания правильной укладки в пространстве. Едва ли в этом отношении ДНК будет отлична от РНК. Из этого следует, что при изучении связывания малой молекулы нуклеиновой кислотой необходимо обращать внимание на координированные в сайте связывания ионы и на их взаимодействие с малой молекулой, ибо без этого образ её взаимодействий с мишенью будет неполон и оттого искажен.

С другой стороны, возможность совместной координации ионов нужно учитывать при рациональной, структурно обоснованной разработке новых соединений, способных

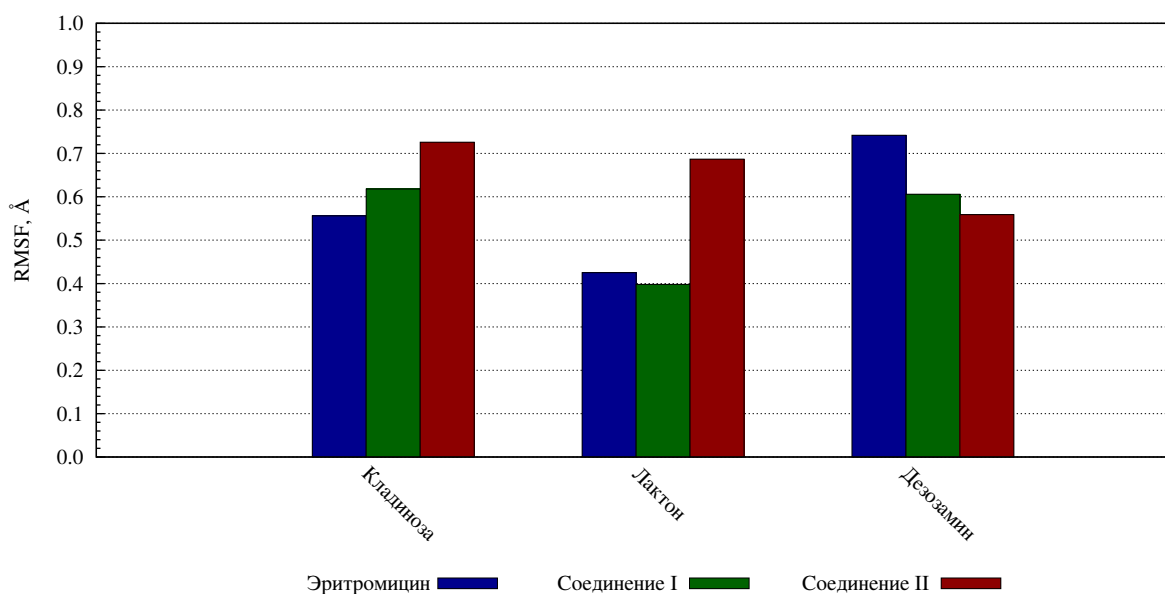


Рис. 3.28. Усредненный по фрагментам RMSF альдегидных производных эритромицина А.

связываться с нуклеиновыми кислотами. В частности, при построении модели мишени для докинга необходимо правильно расставлять в ней ионы и не в коем случае не пренебрегать ими. Оценивающие функции для докинга малых молекул в нуклеиновые кислоты должны также учитывать координацию ионами малого соединения. Вообще, совместная с мишенью координация ионов может соперничать с водородной связью по энергии связывания и пространственной избирательности. Например, энергия водородной связи между двумя молекулами воды оценивается в -33 кДж/моль [205], между двумя молекулами этанола — в -14,5 кДж/моль [206], а энергия координации иона магния карбонильной группой оценена в -170 кДж/моль, что существенно больше. Пространственная избирательность совместной координации, по крайней мере, не уступает таковой водородных связей и обеспечивается необходимостью координирующей группе занять пустующую координационную позицию иона.

Второе соображение касается роли ионов магния в рибосомном туннеле как таковом. Как мы знаем, координация ионов магния несмежными остатками рибосомных РНК служит для поддержания ими своей пространственной структуры. Стенки рибосомного туннеля так же, как и внутренние области рибосомных РНК большой субъединицы, содержат множество сайтов координации ионов магния, которые тоже служат для скрепления третичной структуры. Можно задаться вопросом о том, только ли структурную функцию выполняют эти координированные ионы? Выше обсуждалась их потенциальная роль в связывании малых молекул. Но ведь координированные на стенках туннеля ионы магния могут взаимодействовать с проходящей по туннелю вновь синтезируемой пептидной цепью, облегчая или затрудняя её прохождение. Нельзя исключать и влияние координированных ионов, образующих нечто вроде сильно поляризованных диполей, на свойства воды, заключенной внутри туннеля, как фазы. Последние также влияют как на продвижение пептидной цепи по туннелю, так и на сворачивание её во вторичную структуру⁵.

⁵ Здесь нельзя обойти вниманием работы [143; 144], посвященные моделированию физико-химических свойств рибосомного туннеля (см. 2.3.2). В них уделено недостаточное внимание расстановке ионов, компенсирующих отрицательный заряд рибосомной РНК: при сохранении имеющихся в исходной структуре, полученной методом рентгеноструктурного анализа, ионов магния остаточный отрицательный заряд компенсировался ионами натрия. Между тем, следовало бы занять свободные сайты координации ионов ионами магния — это позволило бы расставить недостающие ионы на стенках рибосомного туннеля. Недостаток скоординированных на стенках рибосомного туннеля ионов может сильно повлиять на результаты моделирования упорядоченности воды и взаимодействия боковых цепей аминокислот со стенками туннеля.

3.5 Изучение связывания аминокислотных производных ОМТ

Одним из этапов исследований производных макролидов был синтез производных тилозина, являющихся 5-О-микаминозилтилонолидом, этерифицированных *N*-*трет*-бутилоксикарбониламинокислотами по 23 положению, сопровождавшийся измерением подавления синтеза люциферазы светлячков рибосомой *E. coli* в бесклеточной системе. При этом выяснилось, что WocGlyOMT превосходит ОМТ по активности в подавлении трансляции, а $\text{Woc}\beta\text{AlaOMT}$ и $\text{Woc}\gamma\text{AbuOMT}$ уступают ОМТ (Рис. 3.29). Эти результаты довольно неочевидны: действительно, ОМТ должен уступать (и уступает) по активности тилозину, поскольку, в отличие от него, не содержит углеводного остатка по 23 положению тилонолида, упрочающего связывание; Woc -глициновый остаток WocGlyOMT мог бы выполнять роль, подобную роли остатка мицинозы в тилозине. Однако почему $\text{Woc}\beta\text{AlaOMT}$ и $\text{Woc}\gamma\text{AbuOMT}$ менее активны, чем ОМТ?

Чтобы составить обоснованное представление о взаимодействии аминокислотных производных ОМТ и причинах различий в их активностях было предпринято молекулярно-динамическое моделирование предполагаемых структур их комплексов с рибосомой *E. coli*, подобное тому, которое проводилось для тилозина (см. 3.1). Исходные структуры комплексов получались совмещением тилонолида моделируемого производного с тилонолидом тилозина, расположенного в рибосомном туннеле (см. 4.1). В ходе моделирования остаток микаминозы был протонирован по 3'-диметиламиновой группе, а макролактонное кольцо было ковалентно связано с экзоциклической аминогруппой остатка A2062, образуя карбиноламиноаую группу. Для построенных таким образом комплексов были получены траектории протяженностью 500 нс для ОМТ, 700 нс для WocGlyOMT , 300 нс для $\text{Woc}\beta\text{AlaOMT}$ и 600 нс для $\text{Woc}\gamma\text{AbuOMT}$.

Анализ полученных траекторий показал, что MSD лактонного кольца составил около 0,06 нм² для ОМТ, 0,01 нм² для WocGlyOMT , 0,02 нм² для $\text{Woc}\beta\text{AlaOMT}$ и 0,03 нм² для $\text{Woc}\gamma\text{AbuOMT}$; смещение WocGlyOMT наименьшее среди всех исследуемых содинений и сопоставимо с таковым тилозина. В целом, величина MSD свидетельствует о том, что ОМТ и его аминокислотные производные не покидают сайт связывания макролидов.

Интересно отметить, что активность исследуемых соединений по подавлению

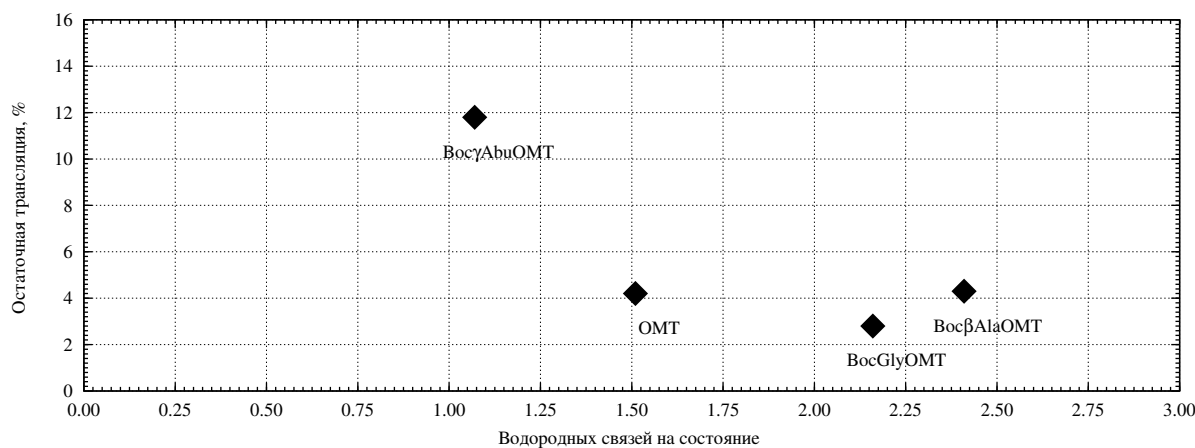


Рис. 3.29. Соотношение остаточной трансляции в системе *in vitro* и среднего числа образуемых водородных связей в кадре траектории для 5-О-микаминозилтилонолида и его аминокислотных производных.

трансляции согласуется со средним числом водородных связей, образуемых соединением в кадре траектории (Рис. 3.29). Однако согласование нарушается для ВосβAlaOMT, который образует немного больше водородных связей, чем ВосGlyOMT, будучи при этом менее активным, чем OMT. Объяснение этого требует пристального взгляда на водородные связи, образуемые этими соединениями с аминокислотными и нуклеотидными остатками, выстилающими рибосомный туннель (Рис. 3.33), поскольку именно эти взаимодействия отвечают за пространственное ориентирование макролида, наиболее выгодное для ковалентного связывания с нуклеотидным остатком A2062.

Понижение ингибирующей активности OMT относительно тилозина неудивительно, поскольку удаление остатков микарозы, и, особенно, мицинозы приводит к существенному обеднению образуемых OMT водородных связей: стабильнейшей водородной связью между 2'-гидроксильной группой остатка микаминозы и N¹ нуклеотидного остатка A2058 и водородной связью между фосфатным кислородом остатка m⁵U и освободившейся 23-гидроксильной группой тилонолида. Возможно, с образованием последней водородной связи связано более сильное взаимодействие тилонолида с рибосомным туннелем, чем у других производных (Рис. 3.32). Как и у тилозина, у OMT карбиноламиновая группа образует внутримолекулярную водородную связь с O9 и O3 тилонолида.

Активность ВосGlyOMT, превосходящая активность остальных исследуемых соединений, объясняется прочными водородными связями, им образуемыми: чрезвычайно прочной водородной связью между 2'-гидроксильной группой остатка микаминозы и N¹ нуклеотидного остатка A2058 и связями между карбонильным

кислородом остатка глицина и экзоциклической аминогруппой гетероциклического основания A752 и ζ -аминогруппой остатка Lys-90 белка L22. Известно, что нуклеотидный остаток A752 образует пару с остатком U2609, являющуюся важным структурным и функциональным элементом рибосомного туннеля [25], вовлеченным во взаимодействие со стоп-пептидом TnaC [207] и макролидами [208–211]. Взаимодействие VocGlyOMT с остатком A752 неминуемо подавит образование этой пары. Кроме того, взаимодействующий с VocGlyOMT аминокислотный остаток Lys-90 белка L22 также связан с действием стоп-пептида TnaC: мутации по положению 90 белка L22 подавляют остановку трансляции TnaC [212]. VocGlyOMT отличается от остальных производных тем, что внутримолекулярная водородная связь образуется карбиноламинной группой не с O9, а только с O3 тилонолида. Также остаток микаминозы VocGlyOMT взаимодействует с рибосомным туннелем сильнее, чем у других производных — ~ -160 кДж/моль против ~ -130 кДж/моль у OMT (Рис. 3.31).

Подобно VocGlyOMT, карбонильный кислород остатка γ -аминомасляной кислоты Voc γ AbuOMT образует устойчивую водородную связь с экзоциклической аминогруппой основания A752. Однако при этом характерная для тилозина и его производных водородная связь между 2'-гидроксильной группой остатка микаминозы и N¹ нуклеотидного остатка A2058 теряет в устойчивости относительно OMT и VocGlyOMT приблизительно вчетверо. Между тем, эта водородная связь важна для правильного расположения 6-ацетальдегидной группы тилонолида относительно экзоциклической аминогруппы остатка A2062, так что её дестабилизация не может не отозваться в понижении вероятности образования ковалентной связи тилонолида с аденином A2062 и, следовательно, в падении прочности комплекса Voc γ AbuOMT с рибосомой. Причиной же такого ослабления взаимодействия остатка микаминозы с рибосомой — ~ -90 кДж/моль у Voc γ AbuOMT против ~ -130 кДж/моль у OMT (Рис. 3.31) — нужно полагать взаимодействие *трет*-бутилоксикарбонильной группы с гидрофобной плоскостью гетероциклического основания G748, выражающееся в большей энергии её нековалентных взаимодействий с рибосомой — ~ -60 кДж/моль у Voc γ AbuOMT против ~ -20 кДж/моль у VocGlyOMT (Рис. 3.30). Это взаимодействие, недоступное для OMT и VocGlyOMT, приводит к смещению Voc γ AbuOMT из сайта связывания макролидов в сторону выхода из рибосомного туннеля, заметном не только по упоминавшемуся выше ослаблению взаимодействия остатка микаминозы с рибосомой, но и в ослаблении

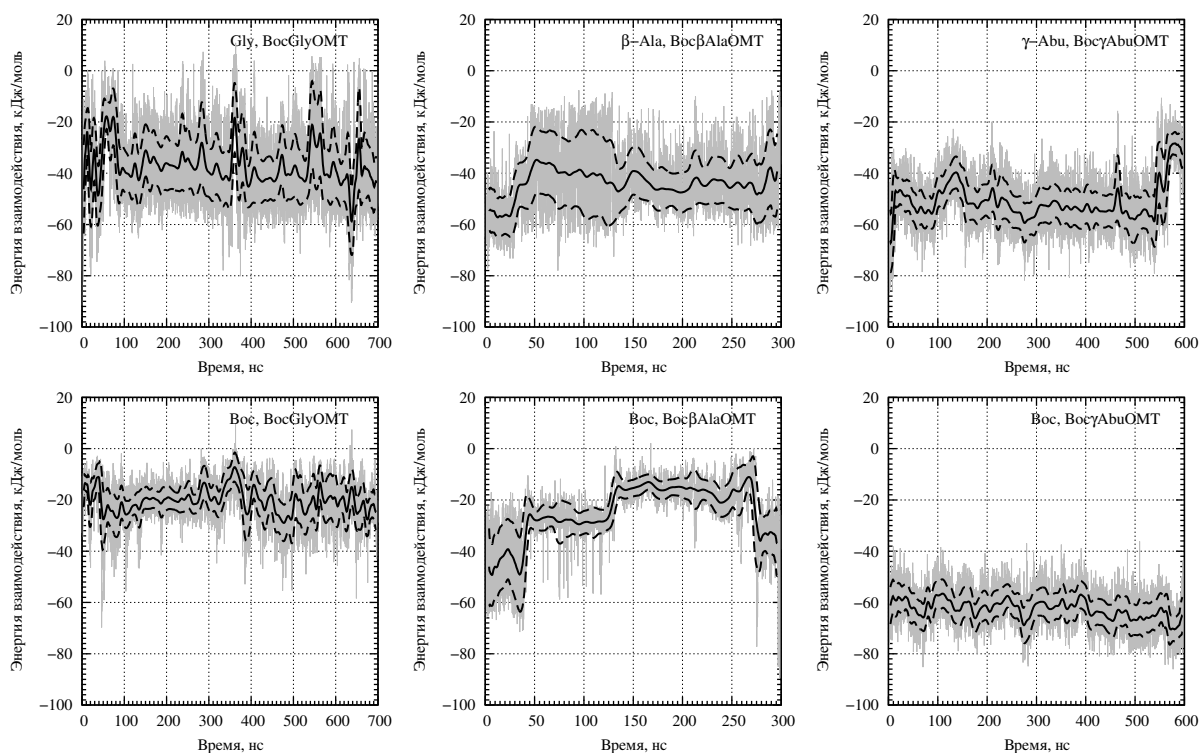


Рис. 3.30. Энергии нековалентных взаимодействий остатков аминокислот и *трет*-бутоксикарбонильных групп аминокислотных производных 5-О-микаминозилтилонолида с рибосомой. Серым показаны значения энергии невалентных взаимодействий, черной сплошной линией — значения энергии, сглаженные скользящим средним с окном 8 нс, черной пунктирной линией — скользящее стандартное отклонение.

взаимодействий тилонолида с рибосомой — ~ -50 кДж/моль у Voc γ AbuOMT против ~ -100 кДж/моль у VocGlyOMT (Рис. 3.32). В целом, это смещение, осложняющее образование ковалентной связи тилонолида с нуклеотидным остатком A2062, может объяснить, почему Voc γ AbuOMT существенно менее активен, чем OMT и, тем более, VocGlyOMT.

Анализ водородных связей, образуемых Voc β AlaOMT, показывает, что это соединение образует устойчивые водородные связи, отличающиеся, однако, от водородных связей, образуемых другими исследуемыми производными: 2'-гидроксильная группа остатка микаминозы образует водородную связь с N¹ нуклеотидного остатка A2059, а не A2058, а O² цитозина C2610 образует водородную связь с 3-гидроксильной группой тилонолида, не встречающуюся у OMT, VocGlyOMT и Voc γ AbuOMT. Карбонильный кислород остатка β -аланина взаимодействует с ζ -аминогруппой остатка Lys-90 белка L22, как и в случае VocGlyOMT. Изменение характера водородных связей Voc β AlaOMT относительно других исследуемых соединений свидетельствует о склонности Voc β AlaOMT разворачиваться в сайте

связывания макролидов, что необходимо должно затруднять образование ковалентной связи между тилонолидом и аденином A2062, подобно тому, как это происходит с $\text{Woc}\gamma\text{AbuOMT}$. *трет*-бутилоксикарбонильная группа и N-конец β -аланина не образуют устойчивых взаимодействий со стенками рибосомного туннеля, беспорядочно двигаясь; таким образом, в этом отношении $\text{Woc}\beta\text{AlaOMT}$ уподобляется OMT, при этом проигрывая ему в вероятности образования ковалентной связи с остатком A2062. С другой стороны, $\text{Woc}\beta\text{AlaOMT}$ образует более устойчивые водородные связи, чем $\text{Woc}\gamma\text{AbuOMT}$, и меньше смещается из сайта связывания макролидов. Итак, $\text{Woc}\beta\text{AlaOMT}$ должен не превосходить OMT по активности, превосходя $\text{Woc}\gamma\text{AbuOMT}$, что и наблюдается в эксперименте по подавлению трансляции *in vitro*.

Таким образом, молекулярно-динамическое исследование взаимодействий, образуемых 5-О-микаминозилтилонолидом и его аминокислотными производными, позволяет объяснить наблюдаемое для них в эксперименте соотношение активностей.

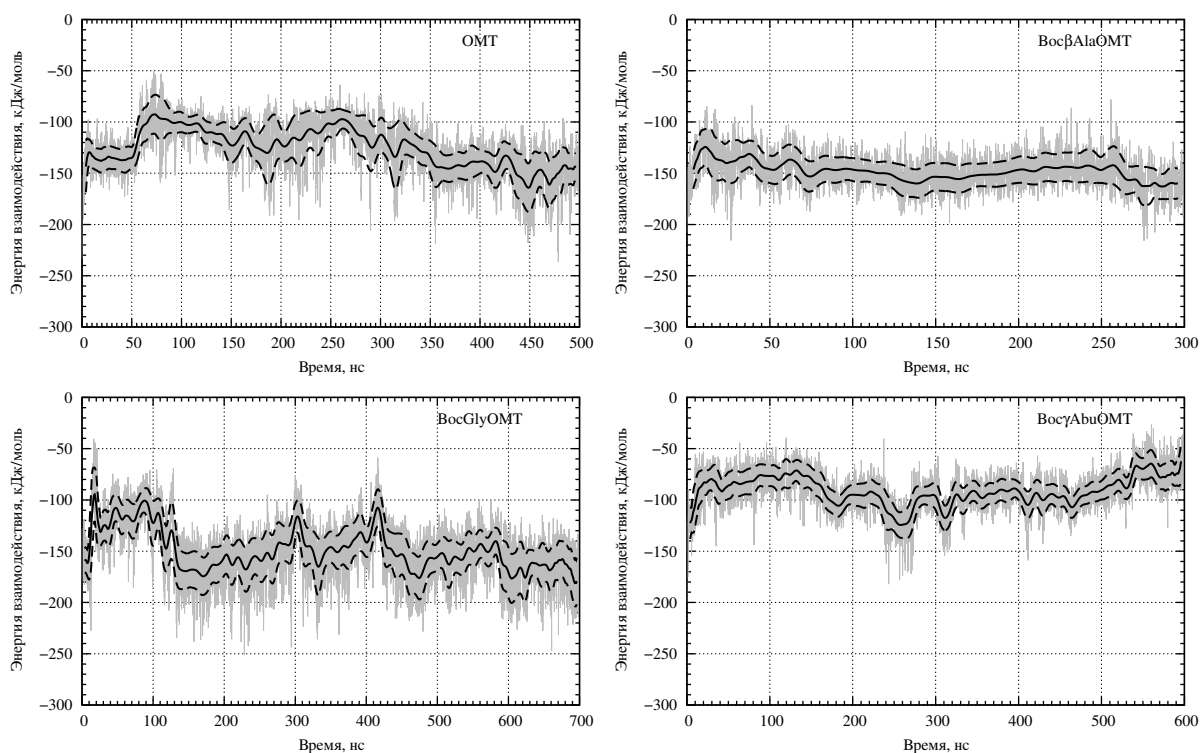


Рис. 3.31. Энергии нековалентных взаимодействий остатков микаминозы 5-О-микаминозилтилонолида и его аминокислотных производных с рибосомой. Серым показаны значения энергии невалентных взаимодействий, черной сплошной линией — значения энергии, сглаженные скользящим средним с окном 8 нс, черной пунктирной линией — скользящее стандартное отклонение.

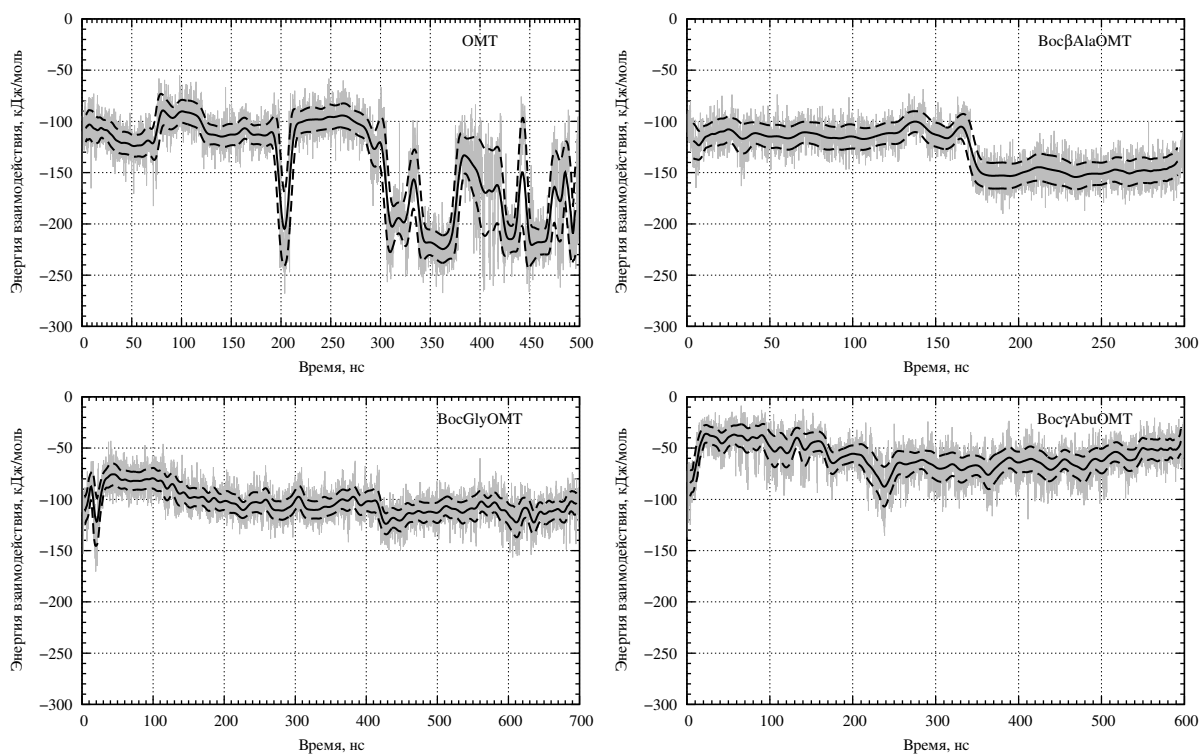


Рис. 3.32. Энергии нековалентных взаимодействий тилонолида 5-О-микаминозилтилонолида и его аминокислотных производных с рибосомой. Серым показаны значения энергии невалентных взаимодействий, черной сплошной линией — значения энергии, сглаженные скользящим средним с окном 8 нс, черной пунктирной линией — скользящее стандартное отклонение.

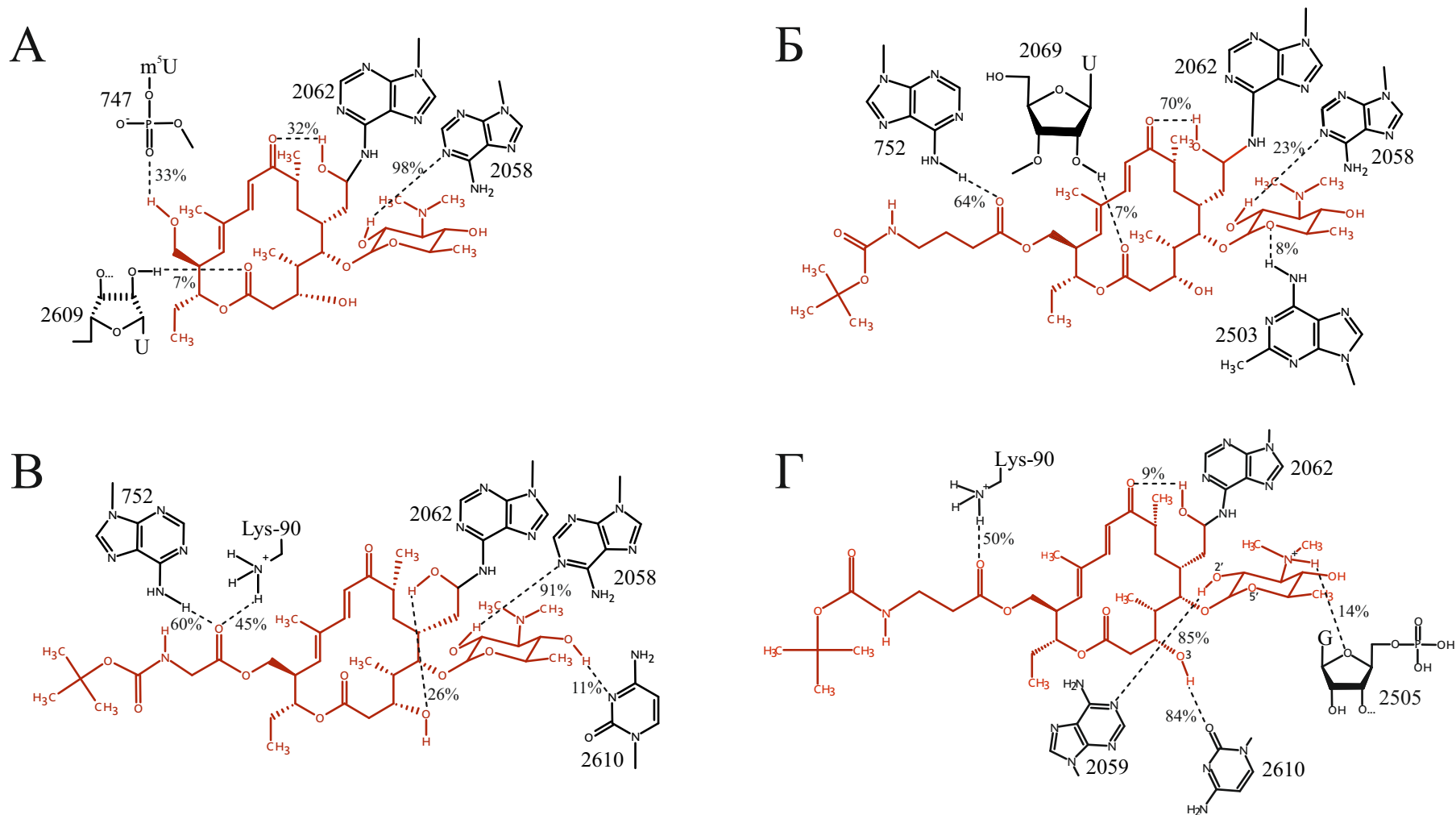


Рис. 3.33. Наиболее устойчивые водородные связи 5-О-микаминозилтилонолида и его аминокислотных производных (выделены красным). Водородные связи изображены пунктиром, рядом подписана частота встречаемости. А: OMT. Б: Voc γ AbuOMT. В: VocGlyOMT. Г: Voc β AlaOMT.

Глава 4

Методы

4.1 Моделируемая система

Структура рибосомы *E. coli* была извлечена из полученной методом рентгеноструктурного анализа структуры с разрешением 3,1Å (код PDB: 4V7U) [25] с добавлением модифицированных оснований в соответствии со сведениями из банка данных [213]. Положения модифицированных оснований были оптимизированы минимизацией энергии сочетанием метода наискорейшего спуска с алгоритмом Бройдена-Флетчера-Гольдфарба-Шанно с ограниченным использованием памяти [214], за которой следовал расчет короткой, продолжительностью 2 нс, молекулярной динамики с шагом интегрирования 2 фс. При этом все немодифицированные основания были полностью зафиксированы, тогда как модифицированные основания, ионы и вода двигались, а эритромицин, содержавшийся в исходной рентгеновской структуре, был изъят. После оптимизации были выделены все остатки, у которых хотя бы один атом попадал в кубическую область с ребром длиной 7 нм, включающую в себя весь рибосомный туннель и пептидилтрансферазный центр так, что центр этой области находился в туннеле, а сам туннель пролегал вдоль мысленной оси аппликат (Рис. 4.1). Полученное выделение стало основой для построения всех смоделированных систем.

При моделировании передачи аллостерических сигналов в рибосомном туннеле описанное выше выделение использовалось для построения моделируемой системы. При моделировании мутаций в первом случае 2-метиладенин в остатке m²A2503 был заменен на гуанин, а во втором случае аденин в остатке A2062 был заменен на урацил.

При моделировании тилозина, 5-О-микаминозилтилонолида и его аминокислотных производных структура комплекса тилозина с рибосомой *E. coli* была сконструирована

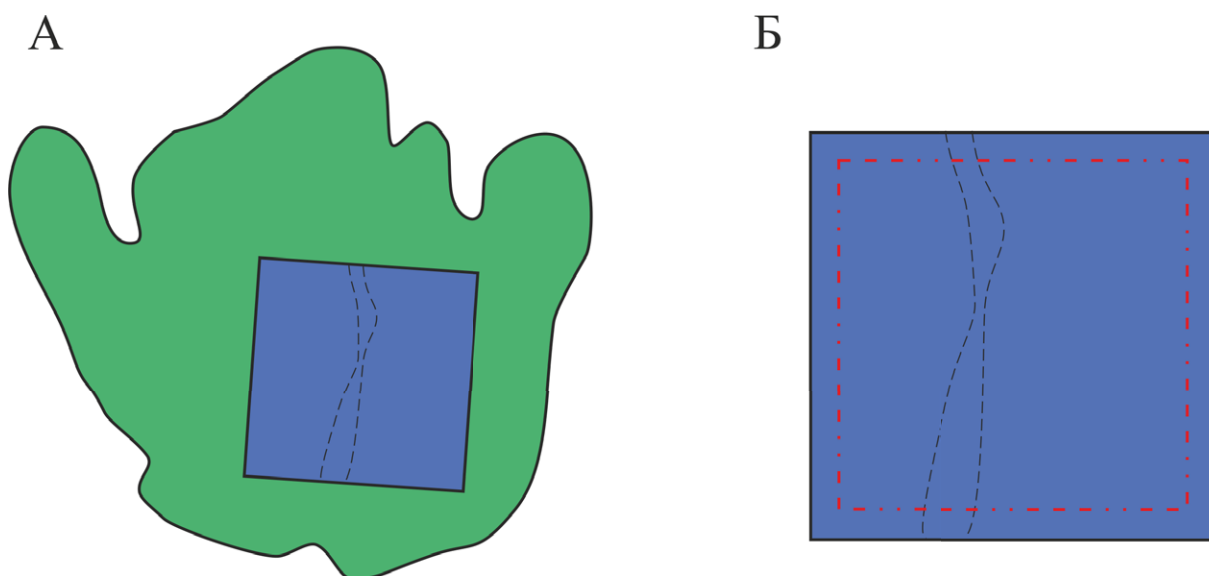


Рис. 4.1. Выделение моделируемого фрагмента (синий) из большой субъединицы рибосомы *E. coli* (зеленая). Пунктиром схематически показано расположение рибосомного туннеля. Б: Моделируемый фрагмент. Подвижность остатков, не входящих в ограниченную красным пунктиром область, ограничивалась. Зазор между гранью этой области и гранью моделируемого фрагмента составляет 0,1 нм.

наложением консервативных остатков A2100, A2101, G2102, A2103 и A2538 структуры комплекса тилозина с рибосомой археи *H. marismortui* (код PDB: 1K9M) [96], полученной методом PCA с разрешением $3,0\text{\AA}$, на соответствующие им остатки A2059, A2060, G2061, A2062 и A2503 описанного выделения. Системы, содержащие ОМТ и его производные (Woc-Gly-ОМТ, Woc- β -Ala-ОМТ, Woc- γ -Abu-ОМТ) изготовлялись наложением структур этих производных на структуру тилозина, установленную в выделении описанным ранее образом.

Сходным образом конструировались системы, несущие альдегидные производные эритромицина: структуры производных накладывались на структуру эритромицина, оставленную в выделении. Для того, чтобы правильно расположить находящиеся на 3'-N остатка дезоамина 2-оксоэтильный и 1-метил-3-оксопропильный фрагменты 3'-N-(2-оксоэтил)-3'-N-дезметилэритромицина А и 3'-N-(1-метил-3-оксопропил)-3'-N-дезметилэритромицина А соответственно был проведен докинг этих соединений в рибосомный туннель посредством программы rDock [215]. В ходе докинга положения и конформации лактонного кольца и остатков сахаров были фиксированы, так что подвижность сохраняли только метиламиноальдегидные фрагменты. Структуры с наилучшими предсказаниями средства каждого из соединений использовались для молекулярно-динамического моделирования. При моделировании эритромицина его оставляли на своем месте.

При моделировании комплексов антибиотиков с большой субъединицей рибосомы с различными типами метилирования остатка A2503 аналогичные выделения получали, накладывая на пустое выделение соответствующие структуры, полученные методом рентгеноструктурного анализа. Для клиндамицина использовали структуру с разрешением 3,29Å (код PDB: 3OFZ) [195], для линезолида — структуру с разрешением 3,5Å (код PDB: 3DLL) [197], для хлорамфеникола — структуру с разрешением 3,19Å (код PDB: 3OFC) [195].

4.2 Условия моделирования

Топологии модифицированных нуклеотидных остатков строились в силовом поле parm99sb [161], а топологии моделируемых антибиотиков в силовом поле GAFF [216]. При этом оптимизированные трехмерные структуры и молекулярные электростатические потенциалы вновь параметризуемых остатков и соединений получались квантово-химическими расчетами методом Хартри-Фока с базисом 6-31G* в пакетах GAUSSIAN 09 и ПРИРОДА [217; 218]. Точечные заряды вычислялись в модели RESP [219].

Все расчеты молекулярной динамики и анализ полученных траекторий проводился с использованием пакета GROMACS [220; 221] версий 4.5.4 [222], 4.6.5 и 5.0.1 [223] и силового поля parm99sb [161]. Все моделирования выполнялись при температуре 300 К с периодом привязки 0,1 пс под управлением термостата масштабирования скоростей с добавочным стохастическим членом [106] и периодических граничных условиях с изотропным постоянным давлением, поддерживаемым баростатом Берендсена [224] с периодом привязки 5 пс. Электростатические взаимодействия обрабатывались посредством сети частиц Эвальда [225] с шагом сетки 0,125 нм и четвертым порядком интерполяции. Моделируемая система была центрирована в кубической ячейке с ребром 8,8 нм, заполненной молекулами воды TIP4P [226], так что грани системы были покрыты слоем растворителя в 0,9 нм. Отрицательный заряд системы был нейтрализован ионами магния и натрия¹. Ионы магния добавляли так, чтобы они образовывали «магниево-мостики» между соседними фосфатными

¹ Ионы натрия использовались в силу неверной параметризации ионов калия в силовом поле parm99sb, основанной на данных для кристаллов хлорида калия. При моделировании ионов калия вместе с ионами хлора в воде они образуют кристалл хлорида калия при недостаточной для этого их концентрации [227]. Взаимодействия между ионами калия и любыми отрицательно заряженными ионами переоценены, следовательно, применение ионов калия как противоионов может приводить к большим возмущениям в моделируемой структуре, чем для ионов натрия.

Таблица 4.1. Параметры молекулярно-динамического моделирования.

Работа	Параметры моделирования			
	Период записи координат, пс	Количество		
		Молекул воды	Ионов натрия	Ионов магния
Конформационный переход в рибосомном туннеле	15	13067	381	95
Производные тилозина	60	13126	381	95
Производные эритромицина	60	13057	0	132
Устойчивость, создаваемая 2,8-диметилированием A2503	15	13070	381	95

группами, а ионы натрия располагали вблизи отрицательно заряженных групп с тем, чтобы компенсировать остаточный отрицательный заряд [228] (скрипт милостиво предоставил А. Залевский). Количество добавленных молекул воды и ионов приведено в таблице 4.1. Остатки, хотя бы один атом которых находится в пределах 0,1 нм от грани моделируемого участка рибосомы, были позиционно ограничены, при том, что все остальные могли свободно двигаться. Временной шаг интегрирования во всех вычислениях составлял 2 фс, период записи координат в файл траектории приведен в таблице 4.1. Для ограничения длин ковалентных связей, включающих атомы водорода, использовался алгоритм LINCS [229]. Вычисления управляемой динамики и метадинамики выполнялись при помощи пакета PLUMED версии 1.3 [230], работающего в комплексе с пакетом GROMACS.

При одном из контрольных моделирований передачи аллостерических сигналов в рибосомном туннеле были избирательно зафиксированы конформации нуклеотидных остатков G2057, A2058 и A2059.

При моделировании комплекса хлорамфеникола с большой субъединицей рибосомы с различными типами метилирования остатка A2503 на расстояния между атомами N3 и N1, C2 и C2, N1 и N3, C6 и C4, C5 и C5, C4 и C6 оснований A2451 и C2452 соответственно накладывали гармонические дистанционные ограничения с силовой константой 50 кДж/моль · нм² и равновесными расстояниями, равными соответствующим расстояниям в исходной структуре.

4.3 Методы анализа траекторий

Написанные для подготовки расчетов и анализа результатов скрипты доступны на GitHub [231], что открывает публичный доступ к программному коду (более 3 тысяч строк), позволяя другим исследователям как использовать его в наличном состоянии, так и создавать на его основе приспособленные к своим потребностям программы.

Анализ местонахождения и частоты встречаемости водородных связей основывался на геометрических критериях: водородная связь считается существующей, если атом-донор водорода и атом-акцептор разделены расстоянием, меньшим $3,5\text{\AA}$, и угол между соединяющей эти атомы линией и связью между атом-донором и ковалентно связанным с ним водородом меньше 30 градусов. Частота встречаемости водородной связи рассчитывалась как отношение количества кадров траектории, в которых обнаружилась данная связь, к общему количеству кадров.

Для анализа основных компонент изменяющихся в траектории торсионных углов нуклеотидных остатков употреблялась специально написанная программа [231]. На вход подавались значения торсионных углов, рассчитанных без периодичности границ (то есть, значения углов не заключались в диапазон от -180 до $+180$ градусов, а изменялись «бесконечно» и в положительную, и в отрицательную сторону). В ходе последующих расчетов по векторам данных \mathbf{X} размерности N вычислялась матрица ковариаций \mathbf{R} размерности $N \times N$:

$$\mathbf{R} = E(\mathbf{X}\mathbf{X}^T), \quad \mathbf{R}^T = \mathbf{R} \quad (4.1)$$

из которой, используя QR-разложение, находили собственные вектора \mathbf{q}_i и соответствующие им собственные значения λ_i

$$\mathbf{R}\mathbf{q}_i = \lambda_i\mathbf{q}_i, \quad i = \{1, \dots, N\} \quad (4.2)$$

В базисе из собственных векторов матрица ковариаций имеет диагональный вид, так что по главной диагонали выстроены собственные значения. При этом, согласно спектральной теореме, матрицу ковариаций можно разложить в виде

$$\mathbf{R} = \sum_{i=1}^N \lambda_i \mathbf{q}_i \mathbf{q}_i^T \quad (4.3)$$

Собственные значения отображают дисперсию по данной главной компоненте. Поэтому можно отобрать те собственные векторы, которым отвечают наибольшие изменения в исходных данных. Это позволяет радикально понизить размерность данных, проецируя исходные данные в подпространство избранных главных компонент:

$$a_j = \mathbf{q}_j^T \mathbf{X}, \quad j = \{1, \dots, M\}, \quad M < N \quad (4.4)$$

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} a_1 \\ \vdots \\ a_M \end{pmatrix} \quad (4.5)$$

где a_j — проекция вектора исходных данных \mathbf{X} на собственный вектор \mathbf{q}_j ; \mathbf{A} , таким образом, проекция исходных данных в подпространство избранных главных компонент меньшей размерности [232].

Оценка изменения ориентации плоскостей оснований в пространстве в траектории производилась посредством особо изготовленной программы [231] следующим образом: сначала по выбранному основанию в исходной структуре, именуемому далее базисным, строились три взаимно перпендикулярные плоскости, причем в первой плоскости лежало выбранное основание, вторая плоскость выбрана так, чтобы в ней лежали два противоположных атома базисного основания, именуемых реперной парой, третья плоскость просто перпендикулярна первым двум. Затем в каждом состоянии анализируемой траектории для выбранных остатков вычислялись три угла между плоскостью их оснований и заданными плоскостями — углы А, В и Г соответственно. Затем строились распределения вероятности для значений этих углов.

Также в ходе анализа использовалась специально разработанную программу [231] для определения существования стэкинга между основаниями в заданной области. Определение основывалось на чисто геометрических соображениях, опираясь на три величины, вычисляемых для каждой анализируемой пары остатков: угол между плоскостями азотистых оснований, длина отрезка, отсекаемого плоскостью второго основания на нормали, исходящей из центра первого основания — оценка межплоскостного расстояния и расстояние между точкой, в которой указанная нормаль пересекается плоскостью второго основания, и центром второго основания — межцентровое расстояние. При этом различалось три случая:

- если межплоскостной угол менее 30 градусов, межплоскостное расстояние между 2,8Å и 4,0Å и межцентровое расстояние менее 5Å, то основания вступили в

стэкинг-взаимодействие;

- если межплоскостной угол менее 30 градусов, межплоскостное расстояние менее 2,8Å и межцентровое расстояние между 5Å и 10Å, то основания образуют комплементарную пару;
- в иных случаях считается, что взаимодействия нет;

Глава 5

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.

Благодарности

Автор благодарен НИВЦ МГУ за предоставленную возможность вести расчеты на суперкомпьютере «Ломоносов»

Автор благодарен А.В. Головину за приобщение к удивительному миру молекулярного моделирования.

Автор благодарен А.А. Богданову за терпимость, учительство и указание научного пути.

Автор благодарит свою жену, Т.М. Макарову, за многую помощь и поддержание веры в человечество.

Автор благодарит своих родителей, И.Г. Макарова и В.М. Макарову, за сообщенные ими нравственные принципы.

Список литературы

1. *Polacek N., Patzke S., Nierhaus K., Barta A.* Periodic conformational changes in rRNA: monitoring the dynamics of translating ribosomes // *Mol. Cell.* — 2000. — Т. 6. — С. 159–171.
2. *Zhou J., Lancaster L., Donohue J. P., Noller H. F.* Crystal structures of EF-G-ribosome complexes trapped in intermediate states of translocation // *Science.* — 2013. — Т. 340. — С. 1236086.
3. *Pulk A., Cate J. H. D.* Control of ribosomal subunit rotation by elongation factor G // *Science.* — 2013. — Т. 340. — С. 1235970.
4. *Ogle J. M., Brodersen D. E., Clemons W. M., Tarry M. J., Carter A. P., Ramakrishnan V.* Recognition of cognate transfer rna by the 30s ribosomal subunit // *Science.* — 2001. — Т. 292. — С. 897–902.
5. *Munro J., Sanbonmatsu K., Spahn C., Blanchard S.* Navigating the ribosome's metastable energy landscape // *Trends Biochem. Sci.* — 2009. — Т. 34. — С. 390–400.
6. *Steitz T. A.* A structural understanding of the dynamic ribosome machine // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2008. — Т. 9. — С. 242–253.
7. *Rheinberger H., Nierhaus K.* Allosteric interactions between the ribosomal transfer RNA-binding sites A and E // *J. Biol. Chem.* — 1986. — Т. 261. — С. 9133–9139.
8. *Bogdanov A., Dontsova O., Dokudovskaya S., Lavrik I.* Structure and function of 5S rRNA in the ribosome // *Biochem. Cell Biol.* — 1995. — Т. 73. — С. 869–876.
9. *Chan Y., Dresios J., Wool I.* A pathway for the transmission of allosteric signals in the ribosome through a network of RNA tertiary interactions // *J. Mol. Biol.* — 2006. — Т. 355. — С. 1014–1025.
10. *Спириин А.* Молек. биол.: Структура рибосомы и биосинтез белка. — Москва : Высшая школа, 1986. — С. 303.

11. *Palade G. E.* A small particulate component of the cytoplasm. // J. Biophysic. Biochem. Cytol. — 1955. — Т. 1. — С. 59—66.
12. *Roberts R. B.* Synthetic aspects of ribosomes. // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1960. — Т. 88. — С. 752—769.
13. *Vasiliev V.* Electron microscopy study of 70S ribosomes of *Escherichia coli* // FEBS Letters. — 1971. — Т. 14. — С. 203—205.
14. *Lake J. A.* Ribosome structure determined by electron microscopy of *Escherichia coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes // J. Mol. Biol. — 1976. — Т. 105. — С. 131—159.
15. *Vasiliev V., Selivanova O., Baranov V., Spirin A.* Structural study of translating 70S ribosomes from *Escherichia coli* // FEBS Letters. — 1983. — Т. 155. — С. 168—172.
16. *Stoffler G., Stoffler-Meilicke M.* Immunoelectron microscopy of ribosomes // Ann. Rev. Biophys. Bioeng. — 1984. — Т. 13. — С. 303—330.
17. *Frank J.* Image analysis of single macromolecules // Electron. Microsc. Rev. — 1989. — Т. 2. — С. 53—74.
18. *Yonath A., Mussig J., Tesche B., Lorenz S., Erdmann V., Wittmann H.* Crystallization of the large ribosomal subunits from *Bacillus stearothermophilus* // Biochem. Int. — 1980. — Т. 1. — С. 428—435.
19. *Trakhanov S., Yusupov M., Shirokov V., Garber M., Mitschler A., Ruff M., Thierry J.-C., Moras D.* Preliminary X-ray investigation of 70S ribosome crystals from *Thermus thermophilus* // J. Mol. Biol. — 1989. — Т. 209. — С. 327—328.
20. *Yusupov M., Garber M., Vasiliev V., Spirin A.* *Thermus thermophilus* ribosomes for crystallographic studies // Biochimie. — 1991. — Т. 73. — С. 887—897.
21. *Ban N., Freeborn B., Nissen P., Penczek P., Grassucci R., Sweet R., Frank J., Moore P., Steitz T.* A 9Å-resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit // Cell. — 1998. — Т. 93. — С. 1105—1115.
22. *Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P., Steitz T.* The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4Å-resolution // Science. — 2000. — Т. 289. — С. 905—920.

23. Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P., Steitz T. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis // *Science*. — 2000. — Т. 289. — С. 920—930.
24. Yusupov M., Yusupova G., Baucom A., Lieberman K., Earnest T., Cate J., Noller H. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution // *Science*. — 2001. — Т. 292. — С. 883—896.
25. Jack A., Dunkle J., Xiong L., Mankin A., Cate J. Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2010. — Т. 107. — С. 17152—17157.
26. Barciszewska M. Z., Wyszko E., Bald R., Erdmann V. A., Barciszewski J. 5S rRNA is a leadzyme. a molecular basis for lead toxicity // *J. Biochem.* — 2003. — Т. 133. — С. 309—315.
27. Stark H., Orlova E., Rinke-Appel J., Junke N., Mueller F., Rodnina M., Wintermeyer W., Brimacombe R., Heel M. van Arrangement of tRNAs in pre- and posttranslocational ribosomes revealed by electron cryomicroscopy // *Cell*. — 1997. — Т. 88. — С. 19—28.
28. Stark H., Rodnina M., Rinke-Appel J., Brimacombe R., Wintermeyer W., Van-Heel M. Visualization of elongation factor Tu on the *Escherichia coli* ribosome // *Nature*. — 1997. — Т. 389. — С. 403—406.
29. Agrawal R., Penczek P., Grassucci R., Li Y., Leith A., Nierhaus K., Frank J. Direct visualization of A-, P-, and E-site transfer RNAs in the *Escherichia coli* ribosome // *Science*. — 1996. — Т. 271. — С. 1000—1002.
30. Agrawal R., Penczek P., Grassucci R., Frank J. Visualization of elongation factor G on the *Escherichia coli* 70S ribosome: the mechanism of translocation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1998. — Т. 95. — С. 6134—6138.
31. Kirpekar F., Hansen L. H., Rasmussen A., Poehlsgaard J., Vester B. The archaeon *Haloarcula marismortui* has few modifications in the central parts of its 23S ribosomal RNA // *J. Mol. Biol.* — 2005. — Т. 348. — С. 563—573.
32. Mengel-Jorgensen J., Jensen S. S., Rasmussen A., Poehlsgaard J., Iversen J. J. L., Kirpekar F. Modifications in *Thermus thermophilus* 23S ribosomal RNA are centered in regions of RNA-RNA contact // *J. Biol. Chem.* — 2006. — Т. 281. — С. 22108—22117.

33. Kowalak J. A., Bruenger E., McCloskey J. A. Posttranscriptional modification of the central loop of domain V in *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA // J. Biol. Chem. — 1995. — Т. 270. — С. 17758—17764.
34. Nissen P., Ippolito J., Ban N., Moore P., Steitz T. RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — Т. 98. — С. 4899—4903.
35. Moore P., Steitz T. The structural basis of large ribosomal subunit function // Annu. Rev. Biochem. — 2003. — Т. 72. — С. 813—850.
36. Noeske J., Wasserman M. R., Terry D. S., Altman R. B., Blanchard S. C., Cate J. H. D. High-resolution structure of the *Escherichia coli* ribosome // Nat. Struct. Mol. Biol. — 2015. — Т. 22. — С. 336—341.
37. Polikanov Y. S., Melnikov S. V., Soll D., Steitz T. A. Structural insights into the role of rRNA modifications in protein synthesis and ribosome assembly // Nat. Struct. Mol. Biol. — 2015. — Т. 22. — С. 342—344.
38. Loubresse N. G. de, Prokhorova I., Holtkamp W., Rodnina M. V., Yusupova G., Yusupov M. Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome // Nature. — 2014. — Т. 513. — С. 517—522.
39. Binshtein E., Ohi M. D. Cryo-electron microscopy and the amazing race to atomic resolution // Biochemistry. — 2015. — Т. 54. — С. 3133—3141.
40. Klaholz B. P., Pape T., Zavialov A. V., Myasnikov A. G., Orlova E. V., Vestergaard B., Ehrenberg M., Heel M. van Structure of the *Escherichia coli* ribosomal termination complex with release factor 2 // Nature. — 2003. — Т. 421. — С. 90—94.
41. Fischer N., Neumann P., Konevega A. L., Bock L. V., Ficner R., Rodnina M. V., Stark H. Structure of the *E. coli* ribosome-EF-Tu complex at < 3 Å resolution by Cs-corrected cryo-EM // Nature. — 2015. — Т. 520. — С. 567—570.
42. Zhang J., Pan X., Yan K., Sun S., Gao N., Sui S.-F. Mechanisms of ribosome stalling by SecM at multiple elongation steps // eLife / под ред. S. H. Scheres. — 2015. — Т. 4. — e09684.
43. Amunts A., Brown A., Toots J., Scheres S. H. W., Ramakrishnan V. The structure of the human mitochondrial ribosome // Science. — 2015. — Т. 348. — С. 95—98.

44. *Samaha R., Green R., Noller H.* A base pair between tRNA and 23S rRNA in the peptidyl transferase centre of the ribosome // *Nature*. — 1995. — Т. 377. — С. 309—314.
45. *Puglisi E., Green R., Noller H., Puglisi J.* Structure of a conserved RNA component of the peptidyl transferase centre // *Nat. Struct. Biol.* — 1997. — Т. 4. — С. 775—778.
46. *Green R., Switzer C., Noller H.* Ribosome-catalyzed peptide-bond formation with an a-site substrate covalently linked to 23S ribosomal rna // *Science*. — 1998. — Т. 280. — С. 286—289.
47. *Schmeing T., Ramakrishnan V.* What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation // *Nature*. — 2009. — Т. 461. — С. 1234—1242.
48. *Ogle J., Brodersen D., Clemons W., Tarry M., Carter A., Ramakrishnan V.* Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit // *Science*. — 2001. — Т. 292. — С. 897—902.
49. *Ogle J., Murphy F., Tarry M., Ramakrishnan V.* Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form // *Cell*. — 2002. — Т. 111. — С. 721—732.
50. *Sievers A., Beringer M., Rodnina M. V., Wolfenden R.* The ribosome as an entropy trap // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2004. — Т. 101. — С. 7897—7901.
51. *Jenni S., Ban N.* The chemistry of protein synthesis and voyage through the ribosomal tunnel // *Cur. Opin. Struct. Biol.* — 2003. — Т. 13. — С. 212—219.
52. *Polacek N., Gaynor M., Yassin A., Mankin A.* Ribosomal peptidyl transferase can withstand mutations at the putative catalytic nucleotide // *Nature*. — 2001. — Т. 411. — С. 498—501.
53. *Hansen J., Schmeing T., Moore P., Steitz A.* Structural insight into peptide bond formation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2002. — Т. 99. — С. 11670—11675.
54. *Schmeing T., Huang K., Strobel S., Steitz T.* An induced-fit mechanism to promote peptide bond formation and exclude hydrolysis of peptidyl-tRNA // *Nature*. — 2005. — Т. 438. — С. 520—524.
55. *Hiller D., Singh V., Zhong M., Strobel S.* A two-step chemical mechanism for ribosome-catalysed peptide bond formation // *Nature*. — 2011. — Т. 476. — С. 236—240.

56. *Maguire B., Beniaminov A., Ramu H., Mankin A., Zimmermann R.* A protein component at the heart of an RNA machine: the importance of protein L27 for the function of the bacterial ribosome // *Mol. Cell.* — 2005. — Т. 20. — С. 427–435.
57. *Moore V., Atchison R., Thomas G., Moran M., Noller H.* Identification of a ribosomal protein essential for peptidyl transferase activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1975. — Т. 72. — С. 844–848.
58. *Trobro S., Åqvist J.* Role of ribosomal protein L27 in peptidyl transfer // *Biochemistry.* — 2008. — Т. 47. — С. 4898–4906.
59. *Voorhees R., Weixlbaumer A., Loakes D., Kelley A., Ramakrishnan V.* Insights into substrate stabilization from snapshots of the peptidyl transferase center of the intact 70S ribosome // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2009. — Т. 16. — С. 528–533.
60. *Weixlbaumer A., Jin H., Neubauer C., Voorhees R., Petry S., Kelley A., Ramakrishnan V.* Insights into translational termination from the structure of RF2 bound to the ribosome // *Science.* — 2008. — Т. 322. — С. 953–956.
61. *Zavialov A., Buckingham R., Ehrenberg M.* A posttermination ribosomal complex is the guanine nucleotide exchange factor for peptide release factor RF3 // *Cell.* — 2001. — Т. 107. — С. 115–124.
62. *Orelle C., Carlson E. D., Szal T., Florin T., Jewett M. C., Mankin A. S.* Protein synthesis by ribosomes with tethered subunits // *Nature.* — 2015. — Т. 524. — С. 119–124.
63. *Ray B. K., Apirion D.* Characterization of 10S RNA: a new stable RNA molecule from *Escherichia coli* // *Molecular and General Genetics.* — 1979. — Т. 174. — С. 25–32.
64. *Felden B., Himeno H., Muto A., McCutcheon J. P., Atkins J. F., Gesteland R. F.* Probing the structure of the *Escherichia coli* 10Sa RNA (tmRNA) // *RNA.* — 1997. — Т. 3. — С. 89–103.
65. *Ramrath D., Yamamoto H., Rother K., Wittek D., Pech M., Mielke T., Loerke J., Scheerer P., Ivanov P., Teraoka Y., Shpanchenko O., Nierhaus K., Spahn C.* The complex of tmRNA-SmpB and EF-G on translocating ribosomes // *Nature.* — 2012. — Т. 485. — С. 526–529.

66. *Himeno H., Kurita D., Muto A.* tmRNA-mediated trans-translation as the major ribosome rescue system in a bacterial cell // *Frontiers in Genetics*. — 2014. — Т. 5. — С. 1–13.
67. *Abo T., Chadani Y.* The fail-safe system to rescue the stalled ribosomes in *Escherichia coli* // *Frontiers in Microbiology*. — 2014. — Т. 5. — С. 1–7.
68. *Богданов А., Сумбатян Н., Шишкина А., Карпенко В., Коршунова Г.* Рибосомный туннель и регуляция трансляции // *Усп. биол. химии*. — 2010. — Т. 50. — С. 5–42.
69. *Voss N., Gerstein M., Steitz T., Moore P.* The geometry of the ribosomal polypeptide exit tunnel // *J. Mol. Biol.* — 2006. — Т. 360. — С. 893–906.
70. *Tenson T., Ehrenberg M.* Regulatory nascent peptides in the ribosomal tunnel // *Cell*. — 2002. — Т. 108. — С. 591–594.
71. *Kramer G., Boehringer D., Ban N., Bukau B.* The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2009. — Т. 16. — С. 589–597.
72. *Giglione C., Filulaine S., Meinnel T.* Cotranslational processing mechanisms: towards a dynamic 3d model // *Trends Biochem. Sci.* — 2009. — Т. 34. — С. 417–426.
73. *Ковальская О., Сергеев П., Богданов А., Донцова О.* Структурно-функциональная анатомия сигнал-узнающей частицы—от бактерий до млекопитающих // *Усп. биол. химии*. — 2007. — Т. 47. — С. 129–188.
74. *Lu J., Kobertz W., Deutsch C.* Mapping the electrostatic potential within the ribosomal exit tunnel // *J. Mol. Biol.* — 2007. — Т. 371. — С. 1378–1391.
75. *Lu J., Deutsch C.* Folding zones inside the ribosomal exit tunnel // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2005. — Т. 12. — С. 1123–1129.
76. *Petrone P., Snow C., Lucent D., Pande V.* Side-chain recognition and gating in the ribosome exit tunnel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2008. — Т. 105. — С. 16549–16554.
77. *Li W. T., Deutsch C.* A folding zone in the ribosomal exit tunnel for kv1.3 helix formation // *J. Mol. Biol.* — 2010. — Т. 396. — С. 1346–1360.

78. *Kosolapov A., Deutsch C.* Tertiary interactions within the ribosomal exit tunnel // Nature Struct. Biol. — 2009. — Т. 16. — С. 405—411.
79. *Bhushan S., Gartmann M., Halic M., Armache J.-P., Jarasch A., Mielke T., Berninghausen O., Wilson D., R. B.* α -helical nascent polypeptide chains visualized within distinct regions of the ribosomal exit tunnel // Nat. Struct. Biol. — 2010. — Т. 17. — С. 313—317.
80. *Tenson T., Ehrenberg M.* Regulatory nascent peptides in the ribosomal tunnel // Cell. — 2002. — Т. 108. — С. 591—594.
81. *Nakatogawa H., Ito K.* The ribosomal exit tunnel functions as a discriminating gate // Cell. — 2002. — Т. 108. — С. 629—636.
82. *Cong F., Yanofsky C.* Instruction of translating ribosome by nascent peptide // Science. — 2002. — Т. 297. — С. 1864—1867.
83. *Vázquez-Laslop N., Thum C., Mankin A.* Molecular mechanism of drug-dependent ribosome stalling // Mol. Cell. — 2008. — Т. 30. — С. 190—202.
84. *Wilson D. N.* The A–Z of bacterial translation inhibitors // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. — 2009. — Т. 44. — С. 393—433.
85. Macrolide antibiotics: chemistry, biology and practice // / под ред. S. Omura. — 2-е изд. — Academic Press, 2002. — Гл. 1.
86. *Tenson T., Lovmar M., Ehrenberg M.* The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome // J. Mol. Biol. — 2003. — Т. 330. — С. 1005—1014.
87. *Kannan K., Vázquez-Laslop N., Mankin A. S.* Selective protein synthesis by ribosomes with a drug-obstructed exit tunnel // Cell. — 2012. — Т. 151. — С. 508—520.
88. *Poulsen S., Kofoed C., Vester B.* Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin // J. Mol. Biol. — 2000. — Т. 304. — С. 471—481.
89. *Liu M., Douthwaite S.* Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Т. 99. — С. 14658—14663.

90. *Hansen L., Mauvais P., Douthwaite S.* The macrolide–ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA // *Mol. Microbiol.* — 1999. — Т. 31. — С. 623–631.
91. *Vester B., Douthwaite S.* Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2001. — Т. 45. — С. 1–12.
92. *Garza-Ramos G., Xiong L., Zhong P., Mankin A.* Binding site of macrolide antibiotics on the ribosome: new resistance mutation identifies a specific interaction of ketolides with rRNA // *J. Bacteriol.* — 2001. — Т. 183. — С. 6898–6907.
93. *Petropoulos A., Kouvela E., Dinos G., Kalpaxis D.* Stepwise binding of tylosin and erythromycin to *Escherichia coli* ribosomes, characterized by kinetic and footprinting analysis // *J. Biol. Chem.* — 2008. — Т. 283. — С. 4756–4765.
94. *Rodriguez-Fonseca C., Amils R., Garrett R.* Fine structure of the peptidyl transferase centre on 23S-like rnas deduced from chemical probing of antibiotic-ribosome complexes // *J. Mol. Biol.* — 1995. — Т. 247. — С. 224–235.
95. *Schlunzen F., Zarivach R., Harms J., Bashan A., Tocilj A., Albrecht R., Yonath A., Franceschi F.* Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria // *Nature.* — 2001. — Т. 413. — С. 814–821.
96. *Hansen J., Ippolito J., Ban N., Nissen P., Moore P., Steitz T.* The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit // *Mol. Cell.* — 2002. — Т. 10. — С. 117–128.
97. *Pfister P., Corti N., Hobbie S., Bruell C., Zarivach R., Yonath A., Bottger E.* 23S rRNA base pair 2057-2611 determines ketolide susceptibility and fitness cost of the macrolide resistance mutation 2058A>G // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2005. — Т. 102. — С. 5180–5185.
98. *Иванов В., Рабинович А., Хохлов А.* Методы компьютерного моделирования для исследования полимеров и биополимеров. — Москва : Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2009. — С. 696.
99. *Weiner P., Kollman P.* Amber: assisted model building with energy refinement. a general program for modeling molecules and their interactions // *J. Comput. Chem.* — 1981. — Т. 2. — С. 287–303.

100. *Weiner S. J., Kollman P. A., Nguyen D. T., Case D. A.* An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids // *J. Comput. Chem.* — 1986. — Т. 7. — С. 230–252.
101. *Weiner S. J., Kollman P. A., Case D. A., Singh U. C., Ghio C., Alagona G., Profeta S., Weiner P.* A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins // *J. Am. Chem. Soc.* — 1984. — Т. 106. — С. 765–784.
102. *Toukmaji A. Y., Jr. J. A. B.* Ewald summation techniques in perspective: a survey // *Comput. Phys. Commun.* — 1996. — Т. 95. — С. 73–92.
103. *Darden T., York D., Pedersen L.* Particle mesh Ewald: an $N\log(N)$ method for Ewald sums in large systems // *J. Chem. Phys.* — 1993. — Т. 98. — С. 10089–10092.
104. *Essmann U., Perera L., Berkowitz M. L., Darden T., Lee H., Pedersen L. G.* A smooth particle mesh Ewald method // *J. Chem. Phys.* — 1995. — Т. 103. — С. 8577–8593.
105. *Harvey S. C., Tan R. K.-Z., Cheatham T. E.* The flying ice cube: velocity rescaling in molecular dynamics leads to violation of energy equipartition // *J. Comput. Chem.* — 1998. — Т. 19. — С. 726–740.
106. *Bussi G., Donadio D., Parrinello M.* Canonical sampling through velocity rescaling // *J. Chem. Phys.* — 2007. — Т. 126. — С. 014107–014106.
107. *Allen M., Tildesley D.* Computer simulation of liquids. — Oxford : Clarendon Press, 1987. — С. 385.
108. *Frenkel D., Smit B.* Understanding molecular simulation. — Academic Press, 2002. — С. 638.
109. *Bonomi M., Branduardi D., Bussi G., Camilloni C., Provasi D., Raiteri P., Donadio D., Marinelli F., Pietrucci F., Broglia R. A., Parrinello M.* Plumed: a portable plugin for free-energy calculations with molecular dynamics // *Comput. Phys. Commun.* — 2009. — Т. 180. — С. 1961–1972.
110. *Shirts M. R., Mobley D. L.* An introduction to best practices in free energy calculations // *Biomolecular Simulations*. Т. 924 / под ред. L. Monticelli, E. Salonen. — Humana Press, 2013. — С. 271–311. — (Methods in Molecular Biology).
111. *Sippl M.* Calculation of conformational ensembles from potentials of mean force. an approach to the knowledge-based prediction of local structures in globular proteins // *J. Mol. Biol.* — 1990. — Т. 213. — С. 859–883.

112. *Sugita Y., Okamoto Y.* Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding // *Chem. Phys. Lett.* — 1999. — Т. 314. — С. 141–151.
113. *Kastner J.* Umbrella sampling // *Wiley. Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* — 2011. — Т. 1. — С. 932–942.
114. *Kumar S., Rosenberg J. M., Bouzida D., Swendsen R. H., Kollman P. A.* The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. i. the method // *J. Comput. Chem.* — 1992. — Т. 13. — С. 1011–1021.
115. *Souaille M., Roux B.* Extension to the weighted histogram analysis method: combining umbrella sampling with free energy calculations // *Comput. Phys. Commun.* — 2001. — Т. 135. — С. 40–57.
116. *Laio A., Parrinello M.* Escaping free-energy minima // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — Т. 99. — С. 12562–12566.
117. *Laio A., Gervasio F. L.* Metadynamics: a method to simulate rare events and reconstruct the free energy in biophysics, chemistry and material science // *Rep. Prog. Phys.* — 2008. — Т. 71. — С. 126601.
118. *Barducci A., Bussi G., Parrinello M.* Well-tempered metadynamics: a smoothly converging and tunable free-energy method // *Phys. Rev. Lett.* — 2008. — ЯНВ. — Т. 100. — С. 020603.
119. *Jarzynski C.* Nonequilibrium equality for free energy differences // *Phys. Rev. Lett.* — 1997. — Т. 78. — С. 2690–2693.
120. *Nowak W., Marszalek P. E.* Molecular dynamics simulations of single molecule atomic force microscope experiments // *Computational Chemistry: Reviews of Current Trends.* — WORLD SCIENTIFIC, 2011. — Гл. 2. С. 47–83.
121. *Hummer G.* Nonequilibrium methods for equilibrium free energy calculations // *Free Energy Calculations.* Т. 86 / под ред. C. Chipot, A. Pohorille. — Springer Berlin Heidelberg, 2007. — С. 171–198. — (Springer Series in CHEMICAL PHYSICS).
122. *Satpati P., Åqvist J.* Why base tautomerization does not cause errors in mRNA decoding on the ribosome // *Nucleic Acids Res.* — 2014. — Т. 42. — С. 12876–12884.
123. *Knight J. L., Brooks C. L.* λ -dynamics free energy simulation methods // *J. Comput. Chem.* — 2009. — Т. 30. — С. 1692–1700.

124. *Satpati P., Bauer P., Åqvist J.* Energetic tuning by tRNA modifications ensures correct decoding of isoleucine and methionine on the ribosome // *Chem. Eur. J.* — 2014. — Т. 20. — С. 10271–10275.
125. *Zeng X., Chugh J., Casiano-Negroni A., Al-Hashimi H. M., III C. L. B.* Flipping of the ribosomal A-site adenines provides a basis for tRNA selection // *J. Mol. Biol.* — 2014. — Т. 426. — С. 3201–3213.
126. *Straatsma T. P., Berendsen H. J. C.* Free energy of ionic hydration: analysis of a thermodynamic integration technique to evaluate free energy differences by molecular dynamics simulations // *J. Chem. Phys.* — 1988. — Т. 89. — С. 5876–5886.
127. *Valle M., Sengupta J., Swami N. K., Grassucci R. A., Burkhardt N., Nierhaus K. H., Agrawal R. K., Frank J.* Cryo-em reveals an active role for aminoacyl-trna in the accommodation process // *EMBO J.* — 2002. — Т. 21. — С. 3557–3567.
128. *Caulfield T., Devkota B.* Motion of transfer RNA from the A/T state into the A-site using docking and simulations // *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* — 2012. — Т. 80. — С. 2489–2500.
129. *Sanbonmatsu K., Joseph S., Tung C.-S.* Simulating movement of tRNA into the ribosome during decoding // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2005. — Т. 102. — С. 15854–15859.
130. *Chirkova A., Erlacher M., Clementi N., Zywicki M., Aigner M., Polacek N.* The role of the universally conserved A2450-C2063 base pair in the ribosomal peptidyl transferase center // *Nucleic Acids Res.* — 2010. — Т. 38. — С. 4844–4855.
131. *Wang Y., Shen J. K., Schroeder S. J.* Nucleotide dynamics at the A-site cleft in the peptidyltransferase center of *H. marismortui* 50S ribosomal subunits // *J. Phys. Chem. Lett.* — 2012. — Т. 3. — С. 1007–1010.
132. *Englander M. T., Avins J. L., Fleisher R. C., Liu B., Effraim P. R., Wang J., Schulten K., Leyh T. S., Gonzalez R. L., Cornish V. W.* The ribosome can discriminate the chirality of amino acids within its peptidyl-transferase center // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2015. — Т. 112. — С. 6038–6043.
133. *Brandman R., Brandman Y., Pande V. S.* A-site residues move independently from P-site residues in all-atom molecular dynamics simulations of the 70S bacterial ribosome // *PLoS ONE.* — 2012. — ЯНВ. — Т. 7. — e29377.

134. *Whitford P., Ahmed A., Yu Y., Hennely S., Tama F., Spahn C., Onuchic J., Sanbonmatsu K.* Excited states of ribosome translocation revealed through integrative molecular modeling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2011. — Т. 108. — С. 18943—18948.
135. *Whitford P. C., Sanbonmatsu K. Y.* Simulating movement of tRNA through the ribosome during hybrid-state formation // *J. Chem. Phys.* — 2013. — Т. 139. — С. 121919.
136. *Noel J. K., Whitford P. C., Sanbonmatsu K. Y., Onuchic J. N.* SMOG@ctbp: simplified deployment of structure-based models in GROMACS // *Nucleic Acids Res.* — 2010. — Т. 38. — W657—W661.
137. *Whitford P. C., Blanchard S. C., Cate J. H. D., Sanbonmatsu K. Y.* Connecting the kinetics and energy landscape of tRNA translocation on the ribosome // *PLoS Comput. Biol.* — 2013. — Март. — Т. 9. — e1003003.
138. *Bock L. V., Blau C., Schroder G. F., Davydov I. I., Fischer N., Stark H., Rodnina M. V., Vaiana A. C., Grubmuller H.* Energy barriers and driving forces in tRNA translocation through the ribosome // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2013. — Т. 20. — С. 1390—1396.
139. *Ishida H., Matsumoto A.* Free-energy landscape of reverse tRNA: translocation through the ribosome analyzed by electron microscopy density maps and molecular dynamics simulations // *PLoS ONE.* — 2014. — Июль. — Т. 9. — e101951.
140. *Bock L. V., Blau C., Vaiana A. C., Grubmuller H.* Dynamic contact network between ribosomal subunits enables rapid large-scale rotation during spontaneous translocation // *Nucleic Acids Res.* — 2015. — Т. 43. — С. 6747—6760.
141. *Cui Q., Tan R.-Z., Harvey S., Case D.* Low-resolution molecular dynamics of the 30S ribosomal subunit // *Multiscale Model. Simul.* — 2006. — Т. 5. — С. 1248—1263.
142. *Zhang Z., Sanbonmatsu K., Voth G.* Key intermolecular interactions in the *E. coli* 70S ribosome revealed by coarse-grained analysis // *J. Am. Chem. Soc.* — 2011. — Т. 133. — С. 16828—16838.
143. *Lucent D., Snow C., Aitken C., Pande V.* Non-bulk-like solvent behavior in the ribosome exit tunnel // *PLoS Comput. Biol.* — 2010. — Т. 6. — e1000963.

144. *Petrone P., Snow C., Lucent D., Pande V.* Side-chain recognition and gating in the ribosome exit tunnel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2008. — Т. 105. — С. 16549–16554.
145. *Ishida H., Hayward S.* Path of nascent polypeptide in exit tunnel revealed by molecular dynamics simulation of ribosome // *Biophys. J.* — 2008. — Т. 95. — С. 5962–5973.
146. *Nilsson O., Hedman R., Marino J., Wickles S., Bischoff L., Johansson M., Muller-Lucks A., Trovato F., Puglisi J., O'Brien E., Beckmann R., Heijne G.* von Cotranslational protein folding inside the ribosome exit tunnel // *Cell Rep.* — 2015. — Т. 12. — С. 1533–1540.
147. *Alexandrov A., Simonson T.* Molecular dynamics simulations of the 30S ribosomal subunit reveal a preferred tetracycline binding site // *J. Am. Chem. Soc.* — 2008. — Т. 130. — С. 1114–1115.
148. *Vaiana A., Sanbonmatsu K.* Stochastic gating and drug-ribosome interactions // *J. Mol. Biol.* — 2009. — Т. 386. — С. 648–661.
149. *Romanowska J., McCammon J., Trylska J.* Understanding the origins of bacterial resistance to aminoglycosides through molecular dynamics mutational study of the ribosomal A-site // *PLoS Comput. Biol.* — 2011. — Т. 7. — e1002099.
150. *Panecka J., Mura C., Trylska J.* Interplay of the bacterial ribosomal A-site, S12 protein mutations and paromomycin binding: a molecular dynamics study // *PLOS One.* — 2014. — Т. 9. — e111811.
151. *Ge X., Roux B.* Calculation of the standard binding free energy of sparsomycin to the ribosomal peptidyl-transferase P-site using molecular dynamics simulations with restraining potentials // *J. Mol. Recogn.* — 2010. — Т. 23. — С. 128–141.
152. *Yam W. K., Wahab H. A.* Molecular insights into 14-membered macrolides using the MM-PBSA method // *J. Chem. Inf. Model.* — 2009. — Т. 49. — С. 1558–1567.
153. *Saini J., Homeyer N., Fulle S., Gohlke H.* Determinants of the species selectivity of oxazolidinone antibiotics targeting the large ribosomal subunit // *Biol. Chem.* — 2013. — Т. 394. — С. 1529–1541.

154. *Sothivelvam S., Liu B., Han W., Ramu H., Klepacki D., Atkinson G. C., Brauer A., Remm M., Tenson T., Schulten K., Vazquez" Laslop N., Mankin A. S.* Macrolide antibiotics allosterically predispose the ribosome for translation arrest // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2014. — Т. 111. — С. 9804—9809.
155. *Small M. C., Lopes P., Andrade R. B., MacKerell Jr A. D.* Impact of ribosomal modification on the binding of the antibiotic telithromycin using a combined grand canonical Monte Carlo/Molecular Dynamics simulation approach // *PLoS Comput. Biol.* — 2013. — Июнь. — Т. 9. — e1003113.
156. *Gupta P., Liu B., Klepacki D., Gupta V., Schulten K., Mankin A. S., Vázquez-Laslop N.* Nascent peptide assists the ribosome in recognizing chemically distinct small molecules // *Nat. Chem. Biol.* — 2016. — Т. 12. — С. 153—158.
157. *Wolf A., Baumann S., Arndt H.-D., Kirschner K. N.* Influence of thiostrepton binding on the ribosomal GTPase associated region characterized by molecular dynamics simulation // *Bioorg. Med. Chem.* — 2012. — Т. 20. — С. 7194—7205.
158. *Коршунова Г., Сумбатян Н., Федорова Н., Кузнецова И., Шишкина А., Богданов А.* Пептидные производные макролидов, родственных тилозину // *Биоорганическая химия.* — 2007. — Т. 33. — С. 235—244.
159. *Starosta A. L., Karpenko V. V., Shishkina A. V., Mikolajka A., Sumbatyan N. V., Schlutzen F., Korshunova G. A., Bogdanov A. A., Wilson D. N.* Interplay between the ribosomal tunnel, nascent chain, and macrolides influences drug inhibition // *Chemistry and Biology.* — United States, 2010. — Т. 17. — С. 504—514.
160. *Шишкина А. В.* Пептидные производные 5-О-микаминозилтилонолида как инструменты для изучения рибосомного туннеля: дизайн, синтез, биологические свойства: дис. . . . канд. / Шишкина А. В. — Москва : МГУ им. М.В. Ломоносова, 2009. — С. 103.
161. *Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C.* Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters // *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* — 2006. — Т. 65. — С. 712—725.
162. *Ito K., Chiba S.* Arrest peptides: cis-acting modulators of translation // *Annu. Rev. Biochem.* — 2013. — Т. 82. — С. 171—202.

163. *Vázquez-Laslop N., Ramu H., Mankin A. S.* Nascent peptide-mediated ribosome stalling promoted by antibiotics // *Ribosomes Structure, Function, and Dynamics* / под ред. М. V. Rodnina, W. Wintermeyer, R. Green. — Wien : Springer-Verlag, 2011. — С. 377—392.
164. *Seidelt B., Innis C. A., Wilson D. N., Gartmann M., Armache J.-P., Villa E., Trabuco L. G., Becker T., Mielke T., Schulten K., Steitz T. A., Beckmann R.* Structural insight into nascent polypeptide chain-mediated translational stalling // *Science*. — 2009. — Т. 326. — С. 1412—1415.
165. *Arenz S., Ramu H., Gupta P., Berninghausen O., Beckmann R., Vázquez-Laslop N., Mankin A. S., Wilson D. N.* Molecular basis for erythromycin-dependent ribosome stalling during translation of the ErmBL leader peptide // *Nat. Commun.* — 2014. — Т. 5. — С. 3501.
166. *Arenz S., Meydan S., Starosta A., Berninghausen O., Beckmann R., Vázquez-Laslop N., Wilson D.* Drug sensing by the ribosome induces translational arrest via active site perturbation // *Mol. Cell*. — 2014. — Т. 56. — С. 446—452.
167. *Kannan K., Mankin A. S.* Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2011. — Т. 1241. — С. 33—47.
168. *Weisblum B.* Erythromycin resistance by ribosome modification. // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 1995. — Т. 39. — С. 577—585.
169. *Hashem Y., Auffinger P.* A short guide for molecular dynamic simulation of rna systems // *Methods*. — 2009. — Т. 47. — С. 187—197.
170. *Чернавский Д.* Синергетика и информация: Динамическая теория информации. — 3-е изд. — Москва : Книжный дом «Либроком», 2009. — С. 304. — (Синергетика: от прошлого к будущему).
171. *Gumbart J., Schreiner E., Wilson D. N., Beckmann R., Schulten K.* Mechanisms of SecM-mediated stalling in the ribosome // *Biophys. J.* — 2012. — Т. 103. — С. 331—341.
172. *Hansen J. L., Moore P. B., Steitz T. A.* Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit // *J. Mol. Biol.* — 2003. — Т. 330. — С. 1061—1075.

173. *Vázquez-Laslop N., Ramu H., Klepacki D., Kannan K., Mankin A. S.* The key function of a conserved and modified rRNA residue in the ribosomal response to the nascent peptide // *EMBO J.* — 2010. — Т. 29. — С. 3108–3117.
174. *Leontis N. B., Stombaugh J., Westhof E.* The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices // *Nucleic Acids Res.* — 2002. — Т. 30. — С. 3497–3531.
175. *Hansen J. L., Schmeing T. M., Moore P. B., Steitz T. A.* Structural insights into peptide bond formation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — Т. 99. — С. 11670–11675.
176. *Youngman E., Brunelle J., Kochaniak A., Green R.* The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release // *Cell.* — 2004. — Т. 117. — С. 589–599.
177. *Polikanov Y., Steitz T., Innis C.* A proton wire to couple aminoacyl-tRNA accommodation and peptide bond formation on the ribosome // *Nature Struct. Mol. Biol.* — 2014. — Т. 21. — С. 787–793.
178. *Sergiev P. V., Lesnyak D. V., Burakovsky D. E., Svetlov M., Kolb V. A., Serebryakova M. V., Demina I. A., Govorun V. M., Dontsova O. A., Bogdanov A. A.* Non-stressful death of 23S rRNA mutant G2061C defective in puromycin reaction // *J. Mol. Biol.* — 2012. — Т. 416. — С. 656–667.
179. *Chirkova A., Erlacher M. D., Clementi N., Zywicki M., Aigner M., Polacek N.* The role of the universally conserved a2450–c2063 base pair in the ribosomal peptidyl transferase center // *Nucleic Acids Res.* — 2010. — Т. 38. — С. 4844–4855.
180. *Leung E. K. Y., Suslov N., Tuttle N., Sengupta R., Piccirilli J. A.* The mechanism of peptidyl transfer catalysis by the ribosome // *Annu. Rev. Biochem.* — 2011. — Т. 80. — С. 527–555.
181. *Bhushan S., Hoffmann T., Seidelt B., Frauenfeld J., Mielke T., Berninghausen O., Wilson D. N., Beckmann R.* SecM-stalled ribosomes adopt an altered geometry at the peptidyl transferase center // *PLoS Biol.* — 2011. — ЯНВ. — Т. 9. — С. 1–10.
182. *Tsai A., Kornberg G., Johansson M., Chen J., Puglisi J.* The dynamics of SecM-induced translational stalling // *Cell Rep.* — 2014. — Т. 7. — С. 1521–1533.

183. *Bischoff L., Berninghausen O., Beckmann R.* Molecular basis for the ribosome functioning as an L-tryptophan sensor // *Cell Rep.* — 2014. — Т. 9. — С. 469–475.
184. *Kannan K., Kanabar P., Schryer D., Florin T., Oh E., Bahroos N., Tenson T., Weissman J. S., Mankin A. S.* The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2014. — Т. 111. — С. 15958–15963.
185. *Yonath A.* Ribosome: an ancient cellular nano-machine for genetic code translation // *Biophysics and the Challenges of Emerging Threats* / под ред. J. D. Puglisi. — Springer Netherlands, 2009. — С. 121–155. — (NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics).
186. *Манькин А.* Рибосомные антибиотики // *Молекул. Биол.* — 2001. — Т. 35. — С. 597–609.
187. *McCusker K., Fujimori D.* The chemistry of peptidyltransferase center-targeted antibiotics: enzymatic resistance and approaches to countering resistance // *ACS Chem. Biol.* — 2012. — Т. 7. — С. 64–72.
188. *Douthwaite S., Jalava J., Jakobsen L.* Ketolide resistance in *Streptococcus pyogenes* correlates with the degree of rRNA dimethylation by Erm // *Mol. Microbiol.* — 2005. — Т. 58. — С. 613–622.
189. *Kuiper E. G., Conn G. L.* Binding induced RNA conformational changes control substrate recognition and catalysis by the thiostrepton resistance methyltransferase (Tsr) // *J. Biol. Chem.* — 2014. — Т. 289. — С. 26189–26200.
190. *Giessing A. M. B., Jensen S. S., Rasmussen A., Hansen L. H., Gondela A., Long K., Vester B., Kirpekar F.* Identification of 8-methyladenosine as the modification catalyzed by the radical SAM methyltransferase Cfr that confers antibiotic resistance in bacteria // *RNA.* — 2009. — Т. 15. — С. 327–336.
191. *Schwarz S., Werckenthin C., Kehrenberg C.* Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri* // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2000. — Т. 44. — С. 2530–2533.
192. *Yan F., LaMarre J. M., Rohrich R., Wiesner J., Jomaa H., Mankin A. S., Fujimori D. G.* RlmN and Cfr are radical SAM enzymes involved in methylation of ribosomal RNA // *J. Am. Chem. Soc.* — 2010. — Т. 132. — С. 3953–3964.

193. *Smith L., Mankin A.* Transcriptional and translational control of the *mlr* operon, which confers resistance to seven classes of protein synthesis inhibitors // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2008. — Т. 52. — С. 1703—1712.
194. *Wilson D. N.* The A–Z of bacterial translation inhibitors // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* — 2009. — Т. 44. — С. 393—433.
195. *Dunkle J. A., Xiong L., Mankin A. S., Cate J. H. D.* Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2010. — Т. 107. — С. 17152—17157.
196. *Kehrenberg C., Schwarz S., Jacobsen L., Hansen L. H., Vester B.* A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503 // *Mol. Microbiol.* — 2005. — Т. 57. — С. 1064—1073.
197. *Wilson D. N., Schluenzen F., Harms J. M., Starosta A. L., Connell S. R., Fucini P.* The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2008. — Т. 105. — С. 13339—13344.
198. *Long K. S., Vester B.* Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2012. — Т. 56. — С. 603—612.
199. *McCusker K. P., Fujimori D. G.* The chemistry of peptidyltransferase center-targeted antibiotics: enzymatic resistance and approaches to countering resistance // *ACS Chem. Biol.* — 2012. — Т. 7. — С. 64—72.
200. *Contreras A., Vazquez D.* Cooperative and antagonistic interactions of peptidyl-tRNA and antibiotics with bacterial ribosomes // *Eur. J. Biochem.* — 1977. — Т. 74. — С. 539—547.
201. *Pestka S., Lemahieu R. A.* Effect of erythromycin analogues on binding of [14C]erythromycin to *Escherichia coli* ribosomes // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 1974. — Т. 6. — С. 479—488.
202. *Locke J. B., Finn J., Hilgers M., Morales G., Rahawi S., C. K. G., Picazo J. J., Im W., Shaw K. J., Stein J. L.* Structure-activity relationships of diverse oxazolidinones for linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* strains possessing the Cfr

- methyltransferase gene or ribosomal mutations // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2010. — Т. 54. — С. 5337–5343.
203. *Cormen T. H., Leiserson C. E., Rivest R. L., Stein C.* Introduction to algorithms //. — 3-е изд. — Cambridge : MIT Press, 2009. — Гл. 25. С. 684–707.
204. *Kirst H. A., Toth J. E., Debono M., Willard K. E., Truedell B. A., Ott J. L., Counter F. T., Felty-Duckworth A. M., Pekarek R. S.* Synthesis and evaluation of tylosin-related macrolides modified at the aldehyde function: a new series of orally effective antibiotics // *J. Med. Chem.* — 1988. — Т. 31. — С. 1631–1641.
205. *Markovitch O., Agmon N.* Structure and energetics of the hydronium hydration shells // *J. Phys. Chem. A.* — 2007. — Т. 111. — С. 2253–2256.
206. *Brink G., Glasser L.* Studies in hydrogen bonding: the enthalpy of hydrogen bond formation of ethanol in carbon tetrachloride solutions // *J. Mol. Struct.* — 1986. — Т. 145. — С. 219–224.
207. *Trabuco L., Harrison C., Schreiner E., Schulten K.* Recognition of the regulatory nascent chain TnaC by the ribosome // *Structure.* — 2010. — Т. 18. — С. 627–637.
208. *Karahalios P., Kalpaxis D. L., Fu H., Katz L., Wilson D. N., Dinos G. P.* On the mechanism of action of 9-O-arylalkyloxime derivatives of 6-O-mycaminylosyltylonolide, a new class of 16-membered macrolide antibiotics // *Mol. Pharmacol.* — 2006. — Т. 70. — С. 1271–1280.
209. *Bulkley D., Innis C. A., Blaha G., Steitz T. A.* Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2010. — Т. 107. — С. 17158–17163.
210. *Llano-Sotelo B., Dunkle J., Klepacki D., Zhang W., Fernandes P., Cate J. H. D., Mankin A. S.* Binding and action of CEM-101, a new fluoroketolide antibiotic that inhibits protein synthesis // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2010. — Т. 54. — С. 4961–4970.
211. *Poehlsgaard J., Andersen N. M., Warrass R., Douthwaite S.* Visualizing the 16-membered ring macrolides tildipirosin and tilmicosin bound to their ribosomal site // *ACS Chem. Biol.* — 2012. — Т. 7. — С. 1351–1355.

212. *Cruz-Vera L., Rajagopal S., Squires C., Yanofsky C.* Features of ribosome-peptidyl-trna interactions essential for tryptophan induction of *tna* operon expression // *Mol. Cell.* — 2005. — Т. 19. — С. 333–343.
213. *Cannone J. J., Subramanian S., Schnare M. N., Collett J. R., D'Souza L. M., Du Y., Feng B., Lin N., Madabusi L. V., Müller K. M., Pande N., Shang Z., Yu N., Gutell R. R.* The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs // *BMC Bioinformatics.* — 2002. — Т. 3. — С. 1–31.
214. *Byrd R., Lu P., Nocedal J.* A limited memory algorithm for bound constrained optimization. // *SIAM J. Scientific. Comput.* — 1995. — Т. 16. — С. 1190–1208.
215. *Ruiz-Carmona S., Alvarez-Garcia D., Foloppe N., Garmendia-Doval A. B., Juhos S., Schmidtke P., Barril X., Hubbard R. E., Morley S. D.* rDock: a fast, versatile and open source program for docking ligands to proteins and nucleic acids // *PLoS Comput. Biol.* — 2014. — Apr. — Т. 10. — e1003571.
216. *Wang J., Wolf R. M., Caldwell J. W., Kollman P. A., Case D. A.* Development and testing of a general amber force field // *J. Comput. Chem.* — 2004. — Т. 25. — С. 1157–1174.
217. *Laikov D. N., Ustynyuk Y. A.* PRIRODA-04: a quantum-chemical program suite. new possibilities in the study of molecular systems with the application of parallel computing // *Russ. Chem. Bull.* — 2005. — Т. 54. — С. 820–826.
218. *Laikov D. N.* A new parametrizable model of molecular electronic structure // *J. Chem. Phys.* — 2011. — Т. 135.
219. *Bayly C. I., Cieplak P., Cornell W., Kollman P. A.* A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model // *J. Phys. Chem.* — 1993. — Т. 97. — С. 10269–10280.
220. *Spoel D. van der, Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A., Berendsen H.* GROMACS: fast, flexible, free // *J. Comput. Chem.* — 2005. — Т. 26. — С. 1701–1718.
221. *Spoel D. van der, Lindahl E., Hess B., Kutzner C.* GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation // *J. Chem. Theory Comput.* — 2008. — Т. 4. — С. 435–447.

222. *Pronk S., Pall S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M. R., Smith J. C., Kasson P. M., Spoel D. van der, Hess B., Lindahl E.* Gromacs 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit // *Bioinformatics*. — 2013. — Т. 29. — С. 845—854.
223. *Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Pall S., Smith J. C., Hess B., Lindahl E.* Gromacs: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX*. — 2015. — Т. 1-2. — С. 19—25.
224. *Berendsen H., Postma J., Gunsteren W. van, DiNola A., Haak J.* Molecular dynamics with coupling to an external bath // *J. Chem. Phys.* — 1984. — Т. 81. — С. 3684—3690.
225. *Darden T., York D., Pedersen L.* Particle mesh Ewald: an $N\log(N)$ method for Ewald sums in large systems // *J. Chem. Phys.* — 1993. — Т. 98. — С. 10089—10092.
226. *Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // *J. Chem. Phys.* — 1983. — Т. 79. — С. 926—935.
227. *Reshetnikov R. V., Sponer J., Rassokhina O. I., Kopylov A. M., Tsvetkov P. O., Makarov A. A., Golovin A. V.* Cation binding to 15-TBA quadruplex DNA is a multiple-pathway cation-dependent process // *Nucleic Acids Res.* — 2011. — Т. 39. — С. 9789—9802.
228. *Athavale S., Petrov A., Hsiao C., Watkins D., Prickett C., Gossett J., Lie L., Bowman J., O'Neill E., Hud C. B. N., Wartell R., Harvey S., Williams L.* RNA folding and catalysis mediated by iron (II) // *Plos One*. — 2012. — Т. 7. — С. 1—7.
229. *Hess B., Bekker H., Berendsen H. J. C., Fraaije J. G. E. M.* LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations // *J. Comput. Chem.* — 1997. — Т. 18. — С. 1463—1472.
230. *Bonomi M., Branduardi D., Bussi G., Camilloni C., Provasi D., Raiteri P., Donadio D., Marinelli F., Pietrucci F., Broglia R. A., Parrinello M.* PLUMED: a portable plugin for free-energy calculations with molecular dynamics // *Comput. Phys. Commun.* — 2009. — Т. 180. — С. 1961—1972.
231. https://github.com/ftorazyne/md_analysis.
232. *Хайкин С.* Нейронные сети: полный курс. — 2-е изд. — Москва : Издательский дом “Вильямс”, 2006. — С. 1104.