

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования

«Южно-Уральский государственный университет
(национальный исследовательский университет)»

Институт естественных и точных наук
Факультет «Химический»

Кафедра «Теоретическая и прикладная химия»

РАБОТА ПРОВЕРЕНА

Рецензент, с.н.с. НИИ ФХБ

им. Белозерского, к.х.н.

_____ / Н.В. Сумбатян /

« ___ » _____ 20 ___ г.

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ

Заведующий кафедрой, д.х.н.

профессор

_____ / О.К. Шарутина /

« ___ » _____ 20 ___ г.

Изучение взаимодействия

L-гистидилхлорамфениколамина с бактериальной рибосомой методом
молекулярно-динамического моделирования

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА К
ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЕ
ЮУрГУ – 04.03.01. 2019. 694. ПЗ ВКР

Руководитель, с.н.с., к.х.н.

_____ / Г.И. Макаров /

« ___ » _____ 20 ___ г.

Автор

студент группы ЕТ-431

_____ / К.А. Косарева /

« ___ » _____ 20 ___ г.

Нормоконтролер, доцент

_____ / О.Н. Груба /

« ___ » _____ 20 ___ г.

Челябинск 2019

РЕФЕРАТ

Косарева К.А. Изучение взаимодействия L–гистидилхлорамфеникола с бактериальной рибосомой методом молекулярно-динамического моделирования – Челябинск: ЮУрГУ, ЕТ-431, 2019. – 38 с., 6 ил., 3 табл., библиогр. список – 41 наим.

L–гистидилхлорамфениколамин, хлорамфеникол, рибосома, антибиотики, молекулярная динамика.

Объектом исследования является L–гистидилхлорамфениколамин.

Цель работы – изучение связывания L-гистидилхлорамфениколамина с бактериальной рибосомой методом моделирования молекулярной динамики

Для достижения цели исследования решены следующие задачи:

- проведен литературный обзор по проблеме исследования;
- выполнен докинг L-HisCam с разными вариантами протонирования имидазольного цикла в РТ и ПТЦ структуры А,А/Р,Р–рибосомы;
- методом моделирования молекулярной динамики изучено связывание L-HisCam с рибосомой *E. coli*;
- проведено сравнение связывания L–HisCam в различных вариантах протонирования имидазольного цикла и сделан вывод об устойчивости комплексов с рибосомой *E. coli*.

Область применения – полученные данные могут применяться для дальнейшей разработки новых антибиотиков, способных подавлять биосинтез белка.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1 История открытия рибосомы.....	8
1.2 Строение и функция бактериальной рибосомы.....	9
1.3 Рибосомный туннель.....	12
1.4 Хлорамфеникол.....	13
1.5 Метод молекулярной динамики.....	16
2 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	24
2.1 Комплекс протонированного по атому N_{π} L–HisCam с рибосомой <i>E. coli</i>	26
2.2 Комплекс протонированного по атому N_{τ} L–HisCam с рибосомой <i>E. coli</i>	27
2.3 Комплекс протонированного по N_{τ} и N_{π} L–HisCam с рибосомой <i>E. coli</i>	28
2.4 Сравнение различных вариантов протонирования L–HisCam.....	29
3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
3.1 Условия моделирования.....	32
3.2 Моделируемая система.....	32
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	34
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	35

ВВЕДЕНИЕ

Многие антибиотики ингибируют синтез белка, избирательно связываясь с бактериальными рибосомами, и тем самым способны излечивать инфекции. Антибиотики могут препятствовать трансляции, взаимодействуя с различными функциональными центрами рибосомы и либо фиксируя определенную конформацию рибосомы, либо препятствуя связыванию ее лигандов. Пептидилтрансферазный центр (ПТЦ), расположенный в большой субъединице рибосомы, является мишенью широкого спектра ингибиторов, принадлежащих к нескольким различным семействам, таким как амфениколы, линкозамиды, оксазолидиноны, плевомутилины, стрептограмин А и другие [1]. Одним из старейших ингибиторов, действующих на ПТЦ, является хлорамфеникол, известный как отличное антибактериальное средство.

Хотя хлорамфеникол не действует на эукариотическую цитоплазматическую рибосому, он легко связывается с рибосомами митохондрий млекопитающих [2 – 6]. Вмешательство в митохондриальную трансляцию, являющееся причиной основных побочных эффектов хлорамфеникола, значительно ограничило медицинское применение этого препарата во многих странах. Одним из подходов к разработке более селективных ингибиторов может быть изменение структуры хлорамфеникола с помощью дополнительных групп, которые будут способствовать взаимодействию конкретно с бактериальной рибосомой. Кроме того, быстрое распространение устойчивости к антибиотикам значительно ограничило медицинскую полезность многих доступных антибиотиков. Поэтому была исследована рибосомная связывающая и ингибирующая активность ряда аминокислотных аналогов хлорамфеникола. Однако ингибирующая способность аналогов не коррелировала с их сродством и в целом аминокислотные аналоги хлорамфеникола были менее активными ингибиторами трансляции по сравнению с оригинальным антибиотиком. Особый интерес вызвал L-гистидил-хлорамфениколамин, который связывается с рибосомой с сродством, превышающим сродство хлорамфеникола в 10 раз.

Целью настоящей работы является изучение связывания L-гистидил-хлорамфениколamina (L-HisCam) с бактериальной рибосомой методом моделирования молекулярной динамики.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 История открытия рибосомы

Белки в живых клетках синтезируются рибосомами. Рибосома – это крупная макромолекула со сложной асимметрической четвертичной структурой, которая построена из белков и рибонуклеиновых кислот. Для выполнения синтеза белка, рибосоме необходим ГТФ (источник энергии), аминокислотные остатки, доставляемые тРНК (материал для строительства полипептидной цепи) и программа, приносимая матричной РНК. Она задаёт порядок чередования аминокислотных остатков в полипептидной цепи белка и исходит от дезоксирибонуклеиновой кислоты, т.е. из генома клетки. Сама рибосома обладает каталитической функцией, ответственной за образование полипептидной связи белка [7].

Впервые цитоплазматические РНК-содержащие гранулы были выделены Альбертом Клодом в 1940 г. Они напоминали лизосомы и митохондрии, но были более мелкими по размеру. Позже они были названы микросомами [8]. С помощью химического эксперимента было установлено, что они являются «фосфолипидно-рибонуклеопротеидными комплексами». Однако, работы Ж.Браше (Бельгия) и Т. Касперсона (Швеция) показали, что РНК локализуется преимущественно в цитоплазме и их количество зависит от интенсивности белкового синтеза [9].

После этого исследователи периодически сообщали о выделении РНК-содержащих частиц, более мелких, чем микросомы, из цитоплазмы растительных и животных клеток. Электронная микроскопия и седиментационный анализ в ультрацентрифуге показывали, что частицы имеют диаметр 10 – 20 нм, сферичны и гомогенны по размеру и обнаруживаются резкие седиментационные границы с коэффициентами седиментации от 30 – 40S до 70 – 90S. В 1952 г Р. Станиером, А.Б. Парди и Г.К. Шахманом (США) было получено первое свидетельство, что такие частицы бактерий являются рибонуклеопротеидами.

Усовершенствованная техника электронной микроскопии и микротомии ультратонких срезов животных клеток привела к выявлению в клетках плотных гранул с диаметром около 15 нм и однородным составом. В 1953 – 1955 гг. Дж. Паладе (США) с помощью электронно-микроскопических исследований показал, что маленькие плотные гранулы в большом количестве находятся в цитоплазме животных клеток [11]. Стало известно, что «гранулы Паладе» представляют основную массу цитоплазматической РНК, обеспечивающий синтез белка и являются рибонуклеопротеидными частицами. Они либо свободно рассеяны в цитоплазме, либо присоединены к мембране эндоплазматического ретикулула.

В 1955 году были опубликованы эксперименты П. Замечника с сотрудниками, которые продемонстрировали, что за включение в синтезированный белок аминокислот отвечают рибонуклеопротеидные частицы микросом.

Наконец, в 1956 – 1958 гг. в США были изучены чистые препараты рибонуклео-протеидных частиц – 80S частиц Г.К. Шахманом и Ф.Ц. Чао из дрожжей, П. Тсо из растений и Дж. Виноградом и Дж. Боннером из животных, а затем Дж. Уотсоном и А. Тиссиером 70S частицы из бактерий. Термин «рибосома» был предложен лишь в 1958 году.

В 1959 году учеными из США Р.Дж. Бриттенем, Р.Б. Робертсом и К. Мак Килленом было установлено, что белки синтезируются в рибосомах и затем распределяются по всем частям клетки бактерии [7].

Кристаллы 70S рибосомы и 30S рибосомной субчастицы *T. thermophilus*, которые пригодны для рентгеноструктурного анализа, были получены в 1987 году [12]. Лишь в 2000 году были получены карты электронной плотности малой субчастицы эубактерии *T. thermophilus* с разрешением 3,04 D [13] и 3,3 D [14], большой субчастицы археи *H. marismortui* с разрешением 2,4 D [15], а также целой 70S рибосомы из *T. thermophilus* с разрешением 5,5 D [16]. С помощью них была определена вторичная структура, форма и относительное расположение большинства белков, пространственная структура рРНК, а также сопоставлены структурные и биохимические данные.

При исследовании структуры рибосомы методом криоэлектронной микроскопии, то есть сквозным просвечиванием электронным пучком, включающего исследуемый объект стекловидного льда при криогенных температурах, восстанавливали электронную плотность биополимера по большому количеству изображений в различных положениях [17]. Первая структура рибосомы, полученная этим методом, относится к 2003 году [18] и имеет разрешение 14 Å. Наивысшее разрешение – 2,8 Å – достигнуто в работе [19] благодаря прямой детекции электронов, коррекции сферических аббераций электронной оптики и совершенному алгоритму сортировки изображений, используемых для восстановления электронной плотности. Преимуществом данного метода является то, что можно анализировать отдельные молекулы, то есть возможно изучать структуру кристаллизуемых комплексов рибосомы с тРНК, мРНК и разнообразными трансляционными факторами, а также исследовать конформацию пептида в рибосомном туннеле и их взаимодействия, как в [20].

1.2 Строение и функция бактериальной рибосомы

В бактериальной клетке рибосомы рассеяны по всей протоплазме, они наполняют клетки, которые ведут интенсивный синтез белка. На одну бактериальную клетку приходится примерно 10^4 рибосом, они составляют около 30 %, а иногда и более, её сухой массы.

Всем прокариотическим клеткам характерны 70S рибосомы, представленные на рисунке 1. Их линейные размеры около 20 – 25 нм в лиофильно-высушенном состоянии, а молекулярная масса приблизительно равна $2,5 \cdot 10^6$ дальтон. По своему составу они состоят только из белка и РНК.

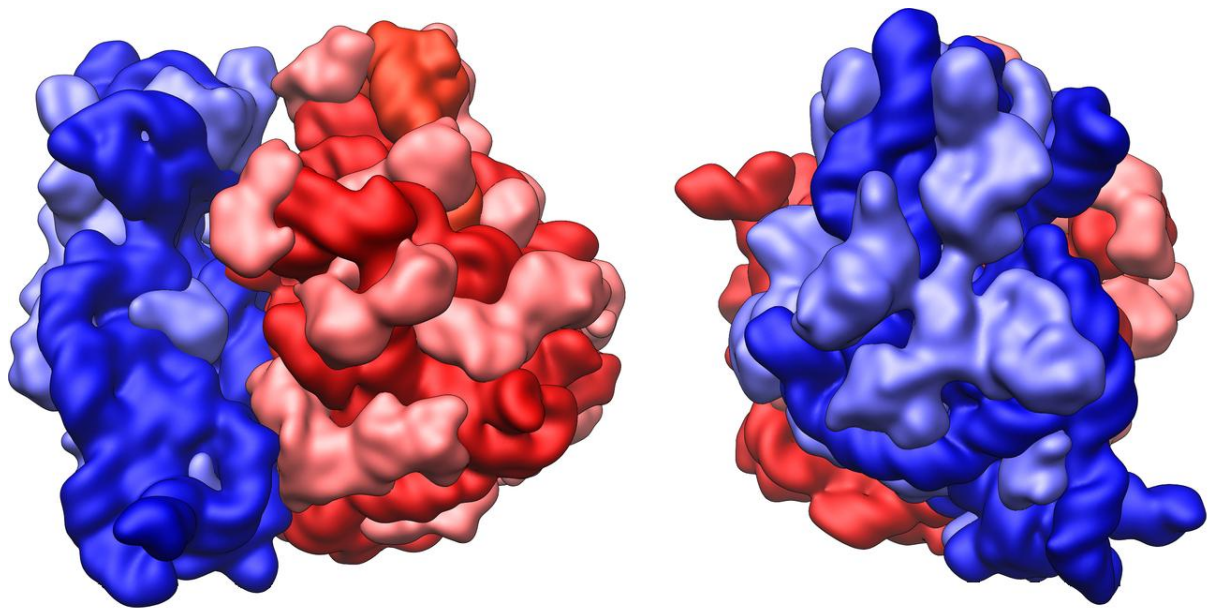


Рисунок 1 – Модель рибосомы *Escherichia coli*. Красным цветом выделена большая субъединица, синим – малая субъединица. Более светлым оттенком показаны рибосомные белки, более темным — рРНК

Малая (30S) субъединица бактериальной рибосомы, обозначаемая как 16S, содержит РНК длиной примерно 1500 – 1600 нуклеотидных остатков, а молекулярная масса составляет около $0,5 \cdot 10^6$ дальтон. 16S это коэффициент седиментации РНК в изолированном состоянии при концентрации одновалентных солей 0,1 М. Присутствие Mg^{2+} не учитывается при определении коэффициента седиментации, поскольку ионы магния делают РНК более компактной и приближающейся к состоянию *in situ*.

Большая (50S) субъединица бактериальной 70S рибосомы имеет РНК длиной около 3000 нуклеотидных остатков, молекулярная масса составляет около 10^6 дальтон и обозначается как 23S. Коэффициент седиментации равен 23S при ионных силах около 0,1 в отсутствие Mg^{2+} .

Как прокариотическая, так и эукариотическая рибосома содержат две различные высокополимерные РНК, по одной на каждую субъединицу, и одну относительно низкомолекулярную РНК, так называемую 5S РНК [21].

Как уже упоминалось ранее, в рибосомах происходит синтез белка. Причём в зависимости от расположения закодированных нуклеотидных комбинаций, перемещение рибосомы вдоль цепи мРНК задаёт определенный порядок вхождения разных аминоксил-тРНК в рибосому. Аминокислотный остаток каждый раз ковалентно связывается с растущей цепью, и деацилированная тРНК освобождается из рибосомы в раствор. Этот процесс называется трансляцией.

Процесс трансляции проходит в три этапа:

1) Инициация – синтез белка начинается с иницирующего кодона (AUG). После транскрипции, мРНК выходит из ядра и направляется к рибосоме, месту синтеза белка. Иницирующий кодон связывает мРНК и две субъединицы рибосомы, в результате чего образуется пептидилтрансферазный центр рибосомы

(ПТЦ). В нем всегда находится два триплета мРНК, образующих два активных центра: А (аминокислотный, или аминоацильный) и Р (пептидный, или пептидилный). В первую очередь к рибосоме присоединяется инициаторная мРНК, с которой начинается синтез белка. По принципу комплементарности инициаторная тРНК своим антикодоном соединяется с первым кодоном на мРНК и входит в рибосому. Образуется комплекс:

Рибосома – мРНК – инициаторная тРНК – аминокислота.

2) Элонгация – процесс, следующий за инициацией. Характеризуется ростом полипептидной цепи. Сначала происходит узнавание аминоацил-тРНК, находящегося в А-участке, затем комплементарное взаимодействие между кодоном и антикодоном, которое циклически повторяется. В процессе наращивания полипептидной цепи принимают участие два белковых фактора элонгации. Первый (EF1a – у эукариот, EF-Tu – у прокариот) переносит заряженную тРНК в А-сайт рибосомы. После формирования пептидной связи, что катализируется рРНК, и переноса связанной с пептидом тРНК из Р-сайта в А-сайт второй белок (EF2 – у эукариот, EF-G – у прокариот) катализирует перемещение рибосомы на один триплет. Таким образом пептидил-тРНК оказывается вновь в Р-сайте, а «пустая» тРНК из Р-сайта – в Е-сайте. Цикл элонгации завершается, когда новая тРНК с антикодоном, подходящим к кодону в А-сайте доставлена EF1a (или EF-Tu). Скорость данного процесса достаточно большая и зависит от температуры.

3) Терминация – последний этап биосинтеза белка, поскольку в аминоацильный центр попадает один из стоп-кодонов и синтез прекращается. Происходит разрыв связи между синтезированным белком и последней тРНК, а место тРНК занимает специфический белок-фермент, который и осуществляет этот разрыв. Рибосома снимается с мРНК и распадается на две субъединицы, последняя тРНК также освобождается и вновь попадает в цитоплазму. Синтезированная молекула белка попадает в ЭПС или цитоплазму.

Процесс трансляции в клетке повторяется многократно. Одновременно может осуществляться синтез нескольких молекул одного белка, если мРНК соединяется с несколькими рибосомами, образуя полирибосому.

Длительность биосинтеза белка зависит от длины собираемого полипептида и лежит в интервале от 20 до 500 секунд. Биосинтез белка протекает как в цитоплазме, так и на гранулярной ЭПС [7].

Основной функцией рибосомы является каталитическая, которая заключается в образовании пептидной связи. Сюда же можно отнести и гидролиз ГТФ (субстрата для синтеза РНК). В большой субъединице рибосомы находятся специальные участки, в которых и происходит процесс синтеза пептидной связи, а также центр необходимый для гидролиза ГТФ. Помимо этого, именно большая субъединица рибосомы во время биосинтеза белка удерживает на себе цепь, которая постепенно вырастает.

1.3 Рибосомный туннель

Рибосомный туннель начинается от пептидилтрансферазного центра и пронизывает насквозь всю большую субъединицу рибосомы. Первые предположения о существовании данной структуры были выдвинуты в начале 1970-х. Они основывались на том, что С – концевые участки белков, длина которых 30 – 40 аминокислотных остатков, не подвержены ферментативному расщеплению. Впоследствии, существование рибосомного туннеля подтвердили методами химического зондирования, криоэлектронной микроскопии и получением полноатомной трехмерной модели рибосомы [22].

Длина рибосомного туннеля составляет около 8 – 10 нм, средний диаметр – 1,5 – 2 нм [23]. В отличие от других клеточных пор и каналов, РТ почти полностью построен из остатков рРНК. В РТ выделяется несколько частей. Длина первой части 1,8 – 2 нм, диаметр – 1,5 нм. Далее туннель изгибается и сужается до 1 нм за счёт образования гидрофобных незаряженных групп остатками белков L4 и L22, которые способствуют продвижению любых полипептидных цепей [24]. Вторая часть имеет максимальный диаметр до 2,5 нм. 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 транспорте секретлируемых белков к рецепторам на клеточных мембранах и ранней стадии котрансляционного процессинга синтезируемых белков [25].

На поверхности рибосомного туннеля отсутствуют протяженные гидрофильные или гидрофобные зоны. А большая часть остатков рРНК, выстилающих туннель, образуют с полипептидной цепью водородные связи и гидрофобные контакты, поскольку обращены внутрь своими гетероциклическими основаниями. Сахарофосфатный остов рРНК создает в РТ неравномерно распределенный отрицательный потенциал [26, 27]. РТ сильно гидратирован и связан с поверхностью большой субъединицы множеством «микрочаналов», пропускающих воду и гидратированные ионы.

В развернутой полипептидной цепи на один остаток приходится примерно 0,35 нм длины цепи, а в свернутой в α -спираль – примерно 0,15 нм. Поэтому можно сказать, что белковая цепь, проходящая по РТ, образует α -спирали прямо в нём. Но сворачивание цепи носит частичный характер, поскольку 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 он защищает 30 – 40 остатков. Образование α -спиралей было обнаружено криоэлектронной микроскопией в третьей части туннеля, которая называется «альфа зоной» [28].

Также РТ принимает участие в регуляции трансляции. В мРНК, кодирующей регулируемые белки, участкам функциональных белков предшествует так

называемая 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 [24], останавливая трансляцию.

В рибосомном туннеле связываются многие антибиотики. Данные рентгеноструктурного анализа говорят о том, что связывание антибиотиков, в основном, обусловлено формированием водородных связей и гидрофобных взаимодействий.

Главной функцией рибосомного туннеля является обеспечение беспрепятственного выхода полипептидной цепи из рибосомы и доставка её к месту формирования функционально полноценной белковой молекулы. Однако, стенки РТ, сформированные преимущественно нуклеотидными остатками 23S рРНК, участвуют в отслеживании аминокислотной последовательности перемещающегося вдоль них полипептида. В ряде случаев происходит остановка трансляции из-за сильного взаимодействия полипептида со стенками РТ. Это событие является ключевым моментом процесса регуляции транскрипции – трансляции ряда генов [22].

1.4 Хлорамфеникол

Рибосома служит мишенью для примерно половины используемых антибиотиков. Причиной тому является применяемая бактериями стратегия защиты от антибиотиков, основанная на мутации участка связывания антибиотика.

К рибосомным антибиотикам относится хлорамфеникол – антибиотик, производимый актиномицетом *S. venezuele* [29], который является ингибитором трансляции бактериальной рибосомы [30]. Он связывается с А-сайтом ПТЦ бактериальной рибосомы, препятствуя связыванию приходящей аминоацил-тРНК [31]. Это представление основывается на совокупности биохимических и структурных данных.

Известны три типа структуры комплекса хлорамфеникола с бактериальной рибосомой. Первой была получена структура комплекса хлорамфеникола с рибосомой *D. radiodurans* [32], в которой хлорамфеникол связывается между разведенных оснований А2451 и С2452 (здесь и далее в нумерации *E. coli*), образуя водородные связи с остатками G2505 и G2061. Следующей была структура комплекса хлорамфеникола с рибосомой *H. marismoruti* [33], в которой хлорамфеникол связывался в сайте связывания макролидов, входя нитрофенильной частью между разведенных оснований G2058 и А2059 так, что карбонильная группа его дихлорацетильного остатка способна образовывать водородную связь с N²H остатка G2058. Последней стала структура комплекса хлорамфеникола с рибосомой *E. coli*, в которой хлорамфеникол связывается в том же сайте, что и в *D. radiodurans*, но в другой ориентации: в этой структуре нитрофенильная часть входит между разведенных оснований А2451 и С2452,

образуя с последним стэкинг-взаимодействие, которое дополняется водородными связями с остатками фосфата и рибозы нуклеотидного остатка G2505. Больше, чем в первой структуре, число имеющих физический смысл межмолекулярных взаимодействий, образуемых хлорамфениколом с нуклеотидными остатками ПТЦ, позволяет считать именно эту последнюю структуру структурой комплекса хлорамфеникола с бактериальной рибосомой [34]. Такое связывание называют каноническим. Таким же образом хлорамфеникол взаимодействует с рибосомой *T. thermophilus* [35]. Однако исследование [36] показало, что, во-первых, присутствие хлорамфеникола не исключает ПТР для любого приносимого остатка и, во-вторых, эффективность подавления трансляции зависит от аминокислотной последовательности синтезируемого пептида, причем особое значение имеет второй от С-конца растущего пептида аминокислотный остаток. Если же хлорамфеникол не подавляет ПТР для любого аминокислотного остатка, то он не подавляет и связывание его аминоацил-тРНК, следовательно, описанный выше сайт связывания хлорамфеникола занят боковой группой приносимого аминокислотного остатка. А значит, в рибосоме, ведущей трансляцию, хлорамфеникол не может его занять. Это рассуждение подкрепляется структурными данными для комплексов рибосомы с тРНК.

Итак, хлорамфеникол, с одной стороны, все же подавляет трансляцию в бактериальной рибосоме, с другой стороны, не может связываться в ведущей трансляцию рибосоме так, как описано в [34]. Следовательно, должен быть другой сайт связывания хлорамфеникола, существующий именно в рибосоме, совершающей ПТР, то есть, связавшей аминоацил- и пептидил-тРНК в А,А- и Р,Р- состояниях соответственно.

В [37] методами молекулярного моделирования построили возможную структуру комплекса хлорамфеникола с рибосомой *E. coli*, находящейся в А,А/Р,Р-состоянии. В ней хлорамфеникол удерживается двумя устойчивыми водородными связями и двумя устойчивыми стэкинг-взаимодействиями, дополняемыми развитым гидрофобным эффектом, что предполагает более прочное взаимодействие хлорамфеникола с этим сайтом связывания, чем с описанным в [34, 35]. Предлагаемая структура отличается от структур комплекса хлорамфеникола с бактериальной рибосомой, полученных методом рентгеноструктурного анализа. Тем не менее, известны данные биохимических экспериментов, подтверждающие результаты данного моделирования.

Антибиотик хлорамфеникол связывается с умеренным сродством в ПТЦ бактериальной рибосомы и ингибирует образование пептидной связи. Для улучшения свойств этого ингибитора была исследована активность ряда аминокислотных аналогов хлорамфеникола. Некоторые из них смогли ингибировать синтез белка и показали отличный от хлорамфеникола механизм связывания. Структуры рибосомы *T. thermophilus* 70S в комплексе с полусинтетическими аналогами, полученные рентгеноструктурным анализом, показали, что производные хлорамфеникола связываются в пептидил-

трансферазном центре, где аминокислотная часть тестируемых соединений взаимодействует с рРНК.

Важно отметить, что согласно данным [38], производное L-HisCam, связывается с рибосомой с более чем 10-кратным более высоким сродством, чем хлорамфеникол ($K_{Dapp}(L-HisCam) = 0,24 \pm 0,06 \mu M$, а $K_{Dapp}(хлорамфеникол) = 2.8 \pm 0.5 \mu M$), поэтому данная структура вызывает особый интерес.

Химический синтез L-HisCam основан на ацилировании хлорамфениколамина (САМ), рисунок 2 [39]. Общая схема синтеза включает три стадии:

- 1) кислотный гидролиз хлорамфеникола с получением САМ;
- 2) ацилирование САМ сукцинимидным эфиром гистидина с защищенной α -аминогруппой;
- 3) удаление защитной группы с полученного производного хлорамфеникола с получением L-HisCam.

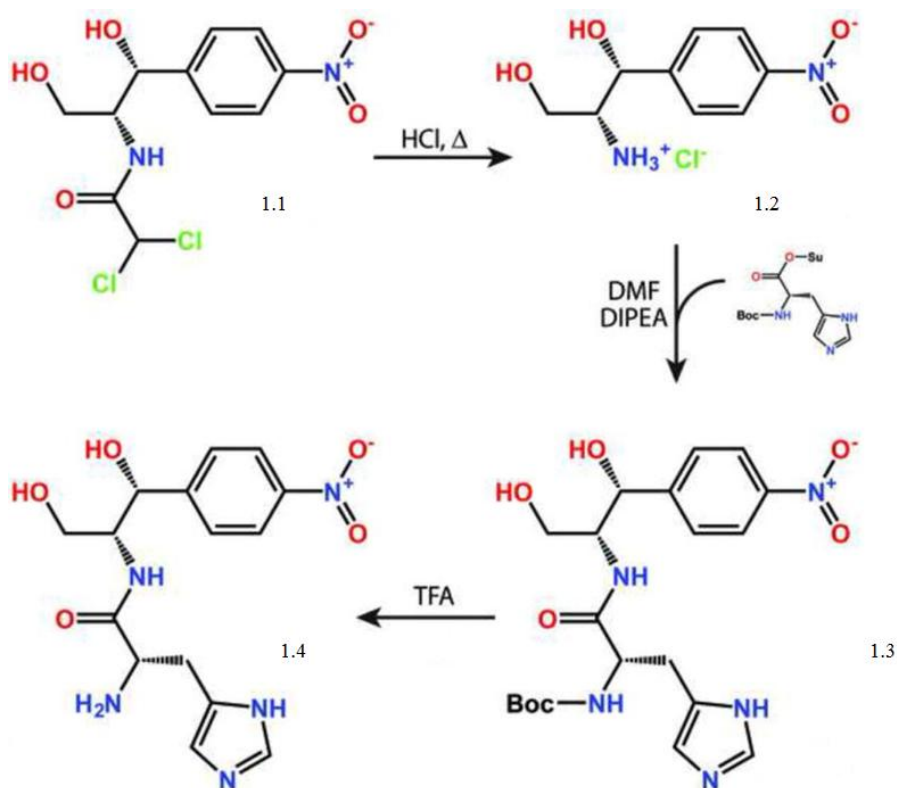


Рисунок 2 – Схема синтеза L-HisCam из хлорамфеникола

Чтобы проверить, коррелирует ли сила связывания с ингибированием трансляции, была проверена способность вмешиваться в синтез белка *in vitro* [38]. Добавление 30 мкМ хлорамфеникола в бесклеточную систему транскрипции-трансляции на основе экстракта клеток *E. coli* привело к почти полному ингибированию синтеза белка люциферазы светлячка. Однако оказалось, что L-HisCam является менее мощным ингибитором трансляции, чем хлорамфеникол и уменьшает выход функциональной люциферазы только на 60 %.

Неспособность L-HisCam эффективно ингибировать синтез может быть объяснена восприимчивостью L-HisCam к действию пептидаз, присутствующих в

бактериальной экстрактной бесклеточной системе белка. Поэтому повторно протестировали ингибирующую активность L-HisCam в чистой бесклеточной системе трансляции, лишенной пептидаз [40]. Хотя общая ингибирующая активность улучшилась в чистой системе по сравнению с эффектом при трансляции в клеточном экстракте, она все еще не достигла уровня ингибирования, вызванного хлорамфениколом. Таким образом, равновесное связывание ингибиторов с вакантной рибосомой часто напрямую не коррелирует с их ингибирующими свойствами.

1.5 Метод молекулярной динамики

Метод молекулярной динамики – метод, в котором временная эволюция системы взаимодействующих атомов или частиц отслеживается интегрированием их уравнений движения.

Классический метод молекулярной динамики исходит из сопоставления реальному молекулярному объекту математического образа системы взаимодействующих материальных точек, движение которых описывается классическими уравнениями Ньютона (1):

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = F_i, i = 1, \dots, N. \quad (1)$$

Здесь m_i – массы атомов в моделируемой системе; $\frac{d^2 r_i}{dt^2}$ – ускорение атома в моделируемой системе; F_i – сила, действующая на частицу с номером i ; N – число атомов в моделируемой системе.

Если рассмотреть очень маленький интервал времени (обозначим его h), то силу в течение этого времени с достаточно высокой точностью можно считать постоянной. Скорость любой частицы $v_i(t)$ и её положение $r_i(t)$ изменяется за время h незначительно и с учетом закона (1) записываются в виде (2) и (3):

$$v_i(t + h) \approx v_i(t) + h \frac{F_i(t)}{m_i}, \quad (2)$$

$$r_i(t + h) \approx r_i(t) + hv_i t. \quad (3)$$

При этом точность, с которой выполняются эти приближенные равенства, будет тем выше, чем меньше величина шага h .

Допустим, что мы умеем вычислять действующие на частицы силы, и что эти силы зависят только от взаимного расположения частиц (4):

$$F_i = F_i(r_1, \dots, r_N), i = 1, \dots, N. \quad (4)$$

Тогда если в начальный момент времени $t = 0$ заданы координаты и скорости всех частиц, то по формуле (4) можно найти действующие на них силы и по формулам (2) и (3) для каждой из частиц найти её новые координаты $r_i(h)$ и

скорости $v_i(h)$ в момент времени $t = h$. Точно так же, зная координаты и скорости всех частиц при $t = h$, можно определить их значения в момент времени $t = 2h$, затем $3h$, $4h$ и т.д. Поступая таким образом можно проследить за поведением молекулярной системы, отвечающим выбранным начальным данным и заданным силам взаимодействия между частицами. В частности, имея значения координат всех частиц в компьютере, можно вывести пространственные изображения молекул на экран графического дисплея в последовательные моменты времени. Мы увидим тепловое движение молекул, молекулярное кино, обусловленное взаимодействием частиц.

Классические уравнения Ньютона (1) описывают динамическое поведение взаимодействующих материальных точек, которое полностью определяется заданием начальных данных – координат и скоростей всех частиц. Уравнения движения имеют первые интегралы – в процессе эволюции системы сохраняются её полная энергия, импульс и момент импульса. При этом молекулярная система приходит к некоему равновесному состоянию, в котором её кинетическая и потенциальная энергии флуктуируют около своих средних значений, являющихся функциями полной энергии. Если число частиц достаточно велико, то состояние системы естественно характеризовать её температурой. По координатам частиц в расчётной ячейке легко восстанавливаются образы частиц в соседних ячейках. Более того, если какая-то из частиц в процессе эволюции системы покинула расчётную ячейку, то в любой момент по её координатам может быть восстановлен и её образ в расчётной ячейке.

Между молекулами в реальных телах действуют силы различной природы. В компьютерном эксперименте такие взаимодействия аппроксимируются потенциальными функциями, зависящими от значений координат всех частиц.

Обозначим через $U(r_1, \dots, r_N)$ потенциальную энергию модельной молекулярной системы. Задание этой функции полностью отражает взаимодействие между частицами. Так, например сила F_i , действующая на i -ю частицу, получается дифференцированием U по соответствующим координатам частицы по формуле (5):

$$F_i = - \frac{\partial U(r_1, \dots, r_N)}{\partial r_i}. \quad (5)$$

Энергия молекулярной системы складывается из энергий валентных связей, валентных углов, торсионных углов, плоских групп, ван-дер-ваальсовых и кулоновских взаимодействий. Функциональный вид (формулы) и параметры этих взаимодействий могут выбираться из различных физических соображений, чтобы добиться более точного воспроизведения тех или иных экспериментальных данных (спектральных, калориметрических, кристаллографических) или результатов квантово-химических расчётов для заданного набора химических соединений. Сюда входят геометрические параметры (длины валентных связей, величины валентных углов, характерные размеры атомов и т.п.), парциальные заряды на атомах, энергетические характеристики взаимодействия (силовые

константы). Параметры этих взаимодействий зависят от типов атомов (и их модификаций) и их различных сочетаний по два (валентные связи, невалентные взаимодействия), три (валентные углы), четыре (торсионные углы и плоские группы) атома. Формулы и таблицы параметров, необходимые для вычисления потенциальной энергии молекулярной системы по координатам атомов, называются силовым полем. В молекулярно-динамических расчётах используют различные силовые поля. Наиболее известные AMBER, CHARMM, GROMOS, DREIDING, OPLS, MM2, MM3, MM4.

При моделировании белков и нуклеиновых кислот одним из наиболее употребительных силовых полей является поле Amber. Полная потенциальная энергия U в этом случае представляется в виде суммы вкладов по формуле (6):

$$U = U_{\text{валентных связей}} + U_{\text{валентных углов}} + U_{\text{торсионных углов}} + U_{\text{плоских групп}} + U_{\text{vdW}} + U_{\text{qq}}, \quad (6)$$

где $U_{\text{валентных связей}}$ – энергия валентных связей; $U_{\text{валентных углов}}$ – энергия валентных углов; $U_{\text{торсионных углов}}$ – энергия торсионных углов; $U_{\text{плоских групп}}$ – энергия плоских групп; U_{vdW} – модифицированный потенциал Леннарда-Джонса; U_{qq} – потенциал кулоновской энергии заряженных частиц.

Эти вклады задаются различными функциями (7 – 11, 14):

$$U_{\text{валентных связей}} = \sum_i K_{l,i} (l_i - l_0)^2, \quad (7)$$

где $K_{l,i}$ – силовая постоянная валентной связи i -ого атома; l_i – валентная связь i -ого атома; l_0 – равновесная валентная связь i -ого атома.

$$U_{\text{валентных углов}} = \sum_i K_{\theta,i} (\theta_i - \theta_0)^2, \quad (8)$$

где $K_{\theta,i}$ – силовая постоянная валентного угла i -ого атома; θ_i – валентный угол i -ого атома; θ_0 – равновесный валентный угол i -ого атома.

$$U_{\text{торсионных углов}} = \sum_i K_{\varphi,i} [1 + \cos(n_i \varphi_i)], \quad (9)$$

где $K_{\varphi,i}$ – силовая постоянная торсионного угла i -ого атома; φ_i – торсионный угол i -ого атома; n_i – целое число, отражающее симметрию потенциала соответствующего торсионного угла i -ого атома.

$$U_{\text{плоских групп}} = \sum_i K_{\psi,i} [1 - \cos(2\psi_i)], \quad (10)$$

где $K_{\psi,i}$ – силовая постоянная плоской группы i -ого атома; ψ_i – угол неплоских отношений i -ого атома.

Нековалентные ван-дер-ваальсовы взаимодействия вычисляются между парами атомов, не связанных валентными связями или валентными углами, и задаются в виде модифицированного потенциала Леннарда-Джонса по формуле (11):

$$U_{\text{vdw}} = \sum_{i < j} \sum_j 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] W_{\text{vdw}}(r_{ij}), \quad (11)$$

где ε_{ij} и σ_{ij} – параметры потенциала Леннард – Джонса, отвечающие типам этих частиц; r_{ij} – расстояние между частицами i и j .

$W_{VdW}(r_{ij})$ – функция переключения, гладко сводящая потенциал в ноль на участке $[R_{on}, R_{off}]$, вычисляется по формуле (12):

$$W_{VdW}(r_{ij}) \begin{cases} 1 & r_{ij} \leq R_{on} \\ \frac{(R_{off}^2 - r_{ij}^2)^2 \cdot (R_{off}^2 - 3R_{on}^2 + 2r_{ij}^2)}{(R_{off}^2 - r_{ij}^2)^3} & R_{on} < r_{ij} < R_{off} \\ 0 & r_{ij} \geq R_{off} \end{cases} . \quad (12)$$

Для частиц разных сортов используются комбинационные правила (13, 14):

$$\sigma_{ij} = \frac{1}{2}(\sigma_{ii} + \sigma_{jj}), \quad (13)$$

$$\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_{ii} \cdot \varepsilon_{jj}}. \quad (14)$$

Кулоновская энергия взаимодействия заряженных атомов характеризуется потенциалом, который рассчитывается по формуле (15):

$$U_{qq} = \sum_{i < j} \sum_j \frac{q_i \cdot q_j}{\varepsilon \cdot r_{ij}} \cdot W_{qq}(r_{ij}), \quad (15)$$

где q_i и q_j – парциальные заряды на атомах i и j ; ε – диэлектрическая проницаемость среды.

$W_{qq}(r_{ij})$ – экранирующая функция с радиусом R_q , которая вычисляется по формуле (16):

$$W_{qq}(r_{ij}) = \begin{cases} (1 - \frac{r_{ij}}{R_q})^2, & r_{ij} < R_q \\ 0, & r_{ij} \geq R_q \end{cases} . \quad (16)$$

Для нахождения действующих на частицы сил из формул для энергетических вкладов (6 – 16) вначале в соответствии с (5) получают аналитические выражения для сил, которые и закладывают в соответствующие вычислительные процедуры. При этом вычисление вкладов от взаимодействий, обусловленных валентными связями (7) и валентными и торсионными углами (8 – 10), хотя порой и громоздко и требует использования трудоемких встроенных функций, не вызывает машинных трудностей – их число относительно невелико (порядка числа частиц в системе N). Другое дело – невалентные взаимодействия. Использование формул (11 – 16) предполагает наличие ненулевых вкладов от таких взаимодействий только в случае, если частицы сблизилась на расстояние меньше R_{off} для ван-дер-ваальсовых и меньше R_{qq} для кулоновских сил. Наличие радиусов взаимодействия для невалентных взаимодействий уменьшает число ненулевых вкладов от $\sim N^2$ (все частицы взаимодействуют со всеми) до величины $\sim C \cdot N$, где C – константа, не зависящая от N и пропорциональная среднему числу частиц, попадающих в

радиус взаимодействия. С учетом того, что N достаточно велико ($>10^4 - 10^5$), подавляющее большинство вкладов от парных взаимодействий оказывается нулевым. Однако использовать это обстоятельство алгоритмически не просто. Даже всего лишь только вычисление расстояний между всеми парами частиц для проверки на их взаимодействие уже обеспечивает трудоемкость $\sim N^2$. Эту операцию необходимо проводить в каждый момент времени, на каждом временном шаге.

Численное интегрирование уравнений движения

Уравнения движения взаимодействующих материальных частиц обычно записывают в виде классических уравнений Ньютона (1).

Удобно также придать им форму системы уравнений 1-го порядка (17):

$$\frac{dr_i(t)}{dt} = v_i, \frac{dv_i(t)}{dt} = \frac{1}{m_i} F_i(r_1, \dots, r_N), i = 1, \dots, N. \quad (17)$$

Интегрирование уравнений движения, представленных в виде (1) или (17), осуществляется численно, посредством перехода к их разностной аппроксимации. Представим наиболее часто используемые алгоритмы.

Пусть $X(t)$, $V(t)$ и $\alpha(t) = F_i(t)/m_i$ – координата, скорость и ускорение для любой из компонент решения уравнений (1) и (17), Предлагаемые здесь разностные схемы и их свойства легко выводятся из рассмотрения разложений в ряды Тэйлора функции $X(t)$ в окрестности произвольного момента времени t_0 . Обозначив $h = t - t_0$, получаем формулы (18,19):

$$X(t_0 + h) = X(t_0) + V(t_0)h + \frac{1}{2} a(t_0)h^2 + \frac{1}{6} X^3(t_0)h^3 + O(h^4), \quad (18)$$

$$X(t_0 - h) = X(t_0) - V(t_0)h + \frac{1}{2} a(t_0)h^2 - \frac{1}{6} X^3(t_0)h^3 + O(h^4), \quad (19)$$

где $O(h^4)$ – члены порядка h^4 и выше.

Сложение строк в (17) даёт выражение для координаты в последующий момент времени через её координаты и ускорение в предыдущие моменты времени (20):

$$X(t_0 + h) = 2X(t_0) - X(t_0 - h) + \alpha(t_0)h^2 + O(h^4). \quad (20)$$

Вычитание второго равенства из первого приводит к выражению (21) для скорости через известные координаты:

$$v(t_0) = \frac{X(t_0+h) - X(t_0-h)}{2h} + O(h^2). \quad (21)$$

Алгоритм Верле (простейшая разностная аппроксимация)

В основу этого алгоритма положено приближение (20). В исходный момент при $t = 0$ считаются известными координаты $r_i(0)$ и скорости $v_i(0)$ всех частиц. Задается шаг численного интегрирования h . Находятся координаты частиц в момент времени $t = h$: $r_i(h) = r_i(0) + hv_i(0)$. Далее в последовательные моменты времени $t = 2h, 3h, 4h$ и т.д. находятся координаты $r_i(t)$ по регулярной схеме.

1) По известным координатам всех атомов находятся силы по формуле (22):

$$F_i(t) = F_i(r_1(t), \dots, r_N(t)). \quad (22)$$

2) Находятся ускорения по формуле (23):

$$a_i(t) = \frac{F_i(t)}{m_i}. \quad (23)$$

3) Вычисляются новые координаты в следующий момент времени по формуле (24):

$$r_i(t+h) = 2r_i(t) - r_i(t-h) + a_i(t)h^2, i = 1, \dots, N. \quad (24)$$

Действия 1–3 повторяются необходимое число раз, обычно примерно 10^6 и более раз. Характеристики моделируемой системы вычисляются в процессе нахождения её траектории, или же координаты атомов с определенным шагом записываются на магнитный диск, а уж затем обрабатываются.

Как следует из описанного алгоритма, скорости частиц прямо не вычисляются. Если такая необходимость имеется, то их можно находить по уже найденным координатам по формуле (25):

$$v_i(t) = \frac{r_i(t+h) - r_i(t-h)}{2h}. \quad (25)$$

Алгоритм с перескоками (алгоритм leap-frog)

Этот алгоритм является некоторой модификацией предыдущего. На регулярном шаге вычисляются как скорости по формуле (26), так и координаты атомов по формуле (27):

$$v_i(t+0,5h) = v_i(t-0,5h) + a_i(t)h, \quad (26)$$

$$r_i(t+h) = r_i(t) + v_i(t+0,5h)h. \quad (27)$$

Следует обратить внимание, что скорости и координаты находятся со сдвигом на полшага. По координатам в момент времени t находятся силы и

соответствующие им ускорения $a_i(t) = F_i(t)/m_i$. Затем находятся скорости в момент времени $t + 0,5h$, после чего – координаты в момент времени $t + h$. И снова вся процедура повторяется. Скорости как бы «перескакивают» через координаты, а координаты «перескакивают» через скорости. Отсюда и название метода «leap-frog», или «чехарда».

Скоростной алгоритм Верле

Для нахождения координат и скоростей атомов в одни и те же моменты времени на регулярном шаге используются формулы (28, 29)

$$r_i(t + h) = r_i(t) + v_i(t)h + 0,5a_i(t)h^2, \quad (28)$$

$$v_i(t + h) = v_i(t) + 0,5[a_i(t) + a_i(t + h)]h. \quad (29)$$

Если в момент времени t известны координаты, скорости и ускорения атомов, то по ним находятся координаты в следующий момент времени $t + h$, затем силы и соответствующие им ускорения, а после этого уже скорости. Эта схема даёт аппроксимацию на шаге решения уравнений движения порядка h^4 для координат и порядка h^3 для скоростей атомов.

Отметим, что приведенные здесь формулы (22 – 24), (26 – 27) и (28 – 29) при численном расчёте траекторий в точности воспроизводят одни и те же значения координат атомов. Это легко проверить. Например, если в формулах (28 – 29) выразить скорости через координаты, используя вторую строку, то после элементарных преобразований придём к соотношению (24). Немного сложнее вывести соотношение (24) из (28 – 29). Различие этих алгоритмов только в удобстве и точности нахождения скоростей. В этом смысле несомненным преимуществом при необходимости одновременного нахождения координат и скоростей частиц обладает скоростной алгоритм Верле.

Температура моделируемой молекулярной системы вычисляется по средней кинетической энергии, приходящаяся на одну степень свободы, согласно формуле (30):

$$\left\langle p_k \frac{\partial E}{\partial p_k} \right\rangle = k_B T; \quad \left\langle q_k \frac{\partial E}{\partial q_k} \right\rangle = k_B T, \quad (30)$$

где p_k – обобщенный импульс k -ого атома; q_k – координата k -ого атома; E – полная энергия системы; k_B – постоянная Больцмана;

Частная производная полной энергии по импульсу равняется соответствующей скорости, поэтому усредняемый член есть ничто иное, как удвоенная компонента кинетической энергии по данной обобщенной координате, определяемая по формуле (31):

$$\langle p_k \frac{\partial E}{\partial p_k} \rangle = \langle p_k q_k \rangle = \langle 2K_k \rangle = k_B T, \quad (31)$$

где K_k – кинетическая энергия.

У системы из N частиц имеется $s = 3N - 6$ внутренних степеней свободы. Предполагая, что моделируемая система совершает малые поступательные движения и вращения, суммируем по внутренним степеням свободы, которым соответствуют компоненты кинетической энергии, и получаем выражения для расчёта температуры (32):

$$T = \frac{\langle 2K \rangle}{k_B s}. \quad (32)$$

Температура моделируемой системы в начальный момент времени задаётся с помощью скоростей всех частиц, генерируемых случайным образом так, чтобы они отвечали распределению Максвелла. В ходе дальнейшего расчёта, температуру системы обычно поддерживают на одном уровне, предполагая, что система находится в термостате с температурой t_{ref} , задаваемой экспериментатором.

При моделировании конденсированного вещества, важной характеристикой его состояния помимо температуры является давление.

Если молекулярная система заключена в какой-то объём, ограниченный непроницаемыми стенками, то давление P на стенку естественно определить, как среднюю на единицу поверхности стенки силу, действующую со стороны молекул в нормальном к ней направлении. Сила на стенку $F_x(t)$ в момент времени t определяется по формуле (33):

$$F_x(t) = \sum_i F_i x^t, \quad (33)$$

где $F_i(t)$ – сила, действующая на стенку со стороны i -й молекулы; x – расстояние между стенками.

Значит давление на стенку рассчитывается по формуле (34):

$$P = -\frac{1}{S} \langle F_x(t) \rangle_t = -\frac{1}{S t_{calc}} \int_0^{t_{calc}} F_x(t) dt, \quad (34)$$

где S – площадь поверхности, t_{calc} – время усреднения [41].

2 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как уже указывалось во введении, целью настоящей работы является изучение связывания L-гистидилхлорамфениколамина (L-HisCam) с бактериальной рибосомой методом моделирования молекулярной динамики. Для её достижения были поставлены следующие задачи:

1. выполнить докинг L-HisCam с разными вариантами протонирования имидазольного цикла в рибосомном туннеле (РТ) и пептидилтрансферазном центре (ПТЦ) структуры A,A/P,P-рибосомы;
2. методом моделирования молекулярной динамики изучить связывание L-HisCam с рибосомой *E. coli*;
3. сравнить связывание L-HisCam в различных вариантах протонирования имидазольного цикла и сделать вывод об устойчивости комплексов с рибосомой *E. coli*.

Хлорамфеникол, антибиотик, принадлежащий к семейству амфениколов, является ингибитором трансляции. Его связывание с рибосомой подробно рассмотрено в [37]. В рибосомном туннеле хлорамфеникол удерживается двумя устойчивыми водородными связями и двумя устойчивыми стэкинг-взаимодействиями, дополняемыми развитым гидрофобным эффектом, что предполагает прочное взаимодействие хлорамфеникола с этим сайтом связывания.

Хлорамфеникол можно селективно модифицировать пептидными или аминокислотными фрагментами. Получаемые таким образом производные служат для моделирования поведения растущего полипептида в рибосомном туннеле. В данной работе рассматривается связывание одного из таких производных, L-гистидилхлорамфениколамина (рисунок 3), с рибосомой.

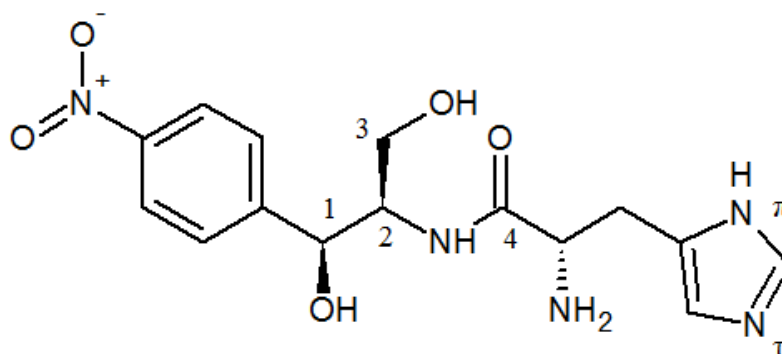


Рисунок 3 – Производное хлорамфеникола L-гистидилхлорамфениколамин

Для объяснения активности L-гистидилхлорамфениколамина необходимо представлять взаимодействие антибиотика с рибосомой на молекулярном уровне, для этого необходима трехмерная структура комплекса антибиотик – рибосома. Мы применили метод молекулярной динамики для моделирования связывания L-гистидилхлорамфениколамина по образцу неканонического комплекса хлорамфеникола с рибосомой *E. coli* в A,A/P,P-состоянии, полученного ранее

[37]. Моделирование молекулярной динамики позволяет изучить изменения конформации исследуемой молекулярной системы во времени. Кроме того, применение этого метода позволяет изучать движение комплекса рибосомы, находящегося в растворе.

Для ускорения расчетов мы не обсчитывали всю большую субъединицу со связанным в ней антибиотиком, а выделили её центральную область, полностью содержащую рибосомный туннель и пептидилтрансферазный центр. Эта область была близка к кубу с ребром длиной 7 нм. Поскольку в моделируемый фрагмент входят ковалентно несвязанные участки цепей биополимеров (рРНК и рибосомных белков), подвижность атомов, лежащих в непосредственной близости от поверхности фрагмента, ограничивали во избежание фрагментации системы. Ограничение подвижности распространялось на те атомы, которые лежали за пределами кубической области с ребром 6,9 нм, находящейся в центре моделируемого фрагмента.

Расчеты проводились на суперкомпьютере «Ломоносов-2» НИВЦ МГУ. Моделирование молекулярной динамики осуществлялось при постоянной температуре, что подразумевает сохранение кинетической энергии при релаксации полной и потенциальной энергий систем. Поэтому моделируемая система, неизбежно находящаяся вблизи того или иного потенциального минимума, в процессе моделирования «скатится» на его дно, перейдя в состояние, близкое к равновесному для заданных условий. Именно для него стоит исследовать структуру комплекса антибиотика с рибосомой и картину их взаимодействий. Однако не существует однозначного критерия, позволяющего утверждать о достижении локального потенциального минимума, опираясь только на данные равновесной молекулярной динамики. Судить об этом приходится по следующим признакам:

- стабилизации величины полной энергии и других величин, изменяющихся во времени;
- стабилизации и насыщению величины среднеквадратичного отклонения структуры изучаемой системы от начального состояния (атомы системы сместились в положения, соответствующие потенциальному минимуму и блуждают вблизи них);
- периодическому появлению и исчезновению водородных связей между одними и теми же группами.

Здесь перечислены те признаки, которые мы использовали в качестве критериев достижения системой потенциального минимума, если не указано иное.

Для того, чтобы предложить структуру комплекса L-гистидил-хлорамфениколамина с рибосомой *E. coli*, находящейся в каноническом A,A/P,P-состоянии, с помощью программы iDock был выполнен докинг L-HisCam с разными вариантами протонирования имидазольного цикла в РТ и ПТЦ структуры A,A/P,P-рибосомы. При этом нитрофенильная часть устанавливалась в

структуре рибосомы по образцу неканонического комплекса хлорамфеникола, а аминогруппа остатка гистидина была протонирована.

Нами были рассмотрены три вида структур комплексов L-гистидилхлорамфениколамина с бактериальной рибосомой в зависимости от типа протонирования его имидазольного цикла: по положению N_{π} , по положению N_{τ} и одновременно по двум этим атомам. Мы выбрали те положения и конформации L-гистидилхлорамфениколамина, для которых докинг предсказал наивысшее сродство к рибосоме, и установили их в кубический фрагмент рибосомы. Для построенных систем была рассчитана равновесная молекулярная динамика с тем, чтобы проверить предсказания докинга. Эти расчеты показали сохранение положений и конформаций L-гистидилхлорамфениколамина, предсказанных докингом, на протяжении всей траектории для всех вариантов протонирования L-HisCam.

2.1 Комплекс протонированного по атому N_{π} L-HisCam с рибосомой *E. coli*

Для L-гистидилхлорамфениколамина, протонированного по атому N_{π} , были рассмотрены две конформации, которые различаются положением остатка гистидина. Из них была выбрана конформация, характеризующаяся наиболее стабильными взаимодействиями L-HisCam с РТ, и именно она выбрана в качестве наиболее вероятно существующей в комплексе протонированного по атому N_{π} L-HisCam с А,А/Р,Р-рибосомой *E. coli* (рисунок 4).

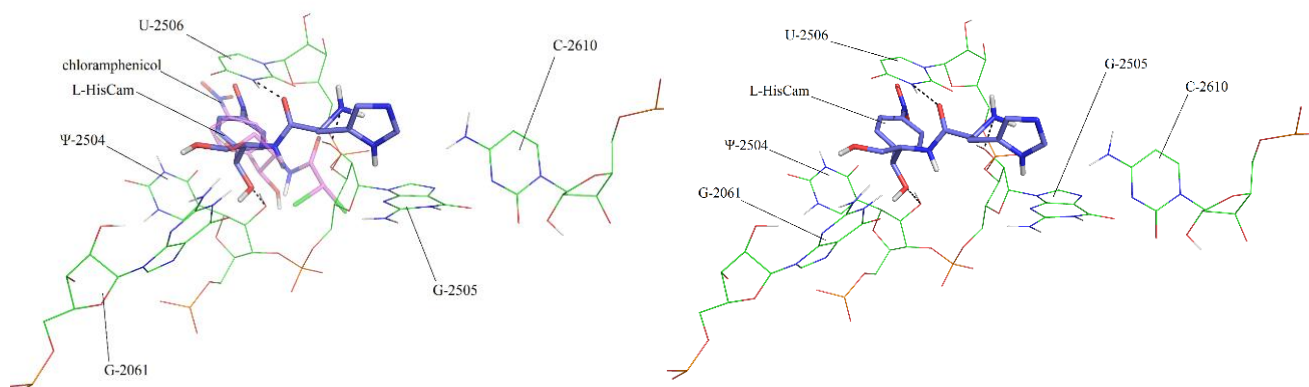


Рисунок 4 – Комплекс протонированного по атому N_{π} L-HisCam с рибосомой *E. coli* (L-HisCam изображен синим цветом, хлорамфеникол розовым)

При таком взаимодействии L-гистидилхлорамфениколамин удерживается водородными связями между N^3H остатка U2506 и карбонильным кислородом L-гистидилхлорамфениколамина, между 2'-гидроксильной группой остатка Ψ2504 и 1-гидроксильным атомом кислорода L-HisCam, а также между 2'-гидроксильным кислородом остатка G2505 и N-концевой аминогруппой гистидинового остатка L-гистидилхлорамфеникола. Водородные связи

приведены в таблице 1. Величина встречаемости есть доля состояний на выбранном участке траектории, в которых обнаружена данная водородная связь.

Таблица 1 – Встречаемости водородных связей в моделируемых траекториях комплексов рибосомы *E. coli* с L-HisCam с различными вариантами протонирования L-HisCam

Донор	Акцептор	Встречаемость, %		
		Протонированный по атому N _π	Протонированный по атому N _τ	Протонированный по атому N _π + N _τ
L-HisCam/N-H	G-2505/O ₂ '	34	0	0
L-HisCam/N-H	U-2585/O ⁴	19	0	85
L-HisCam/N ₁ -H	G-2061/O ⁶	24	0	0
L-HisCam/O₁-H	Ψ-2504/O₂'	35	98	92
L-HisCam/N ₂ -H	G-2505/O ₂ '	0	31	76
L-HisCam /N-H	m ² A-2503/N ⁷	0	58	0
L-HisCam/N _τ -H	C-2611/N ³	0	59	0
L-HisCam/N-H	U-2506/O ²	7	0	52
U-2506/N ³ -H	L-HisCam/O	67	0	63
G-2061/N ¹ -H	L-HisCam/O	1	78	2
G-2061/N ² -H	L-HisCam/O	0	76	0

Кроме водородных связей, L-гистидилхлорамфениколамин удерживается в рибосоме стэкинг-взаимодействиями между нитрофенильным фрагментом L-гистидилхлорамфениколамина и основаниями U2506 и Ψ2504, дополняемыми гидрофобным эффектом, поскольку нитрофенильный фрагмент погружен в гидрофобную полость между основаниями U2506 и Ψ2504. Результаты анализа стэкинг-взаимодействий приведены в таблице 2. Величина встречаемости есть доля состояний на выбранном участке траектории, в которых обнаружено стэкинг-взаимодействие.

Таблица 2 – Встречаемости стэкинг-взаимодействия в моделируемых траекториях комплексов рибосомы *E. coli* с L-HisCam с различными вариантами протонирования L-HisCam

Остаток 1	Остаток 2	Встречаемость, %		
		Протонированный по атому N _π	Протонированный по атому N _τ	Протонированный по атому N _π + N _τ
L-HisCam	Ψ-2504	57	88	90
L-HisCam	U-2506	97	69	98

2.2 Комплекс протонированного по атому N_τ L-HisCam с рибосомой *E. coli*

Для L-гистидилхлорамфениколамина, протонированного по атому N_{τ} , были рассмотрены две структуры с различными конформационными положениями остатка гистидина. Из них была выбрана конформация, характеризующаяся наиболее стабильными взаимодействиями L-HisCam с рибосомным туннелем (рисунок 5).

В этом комплексе L-гистидилхлорамфениколамин удерживается прочными водородными связями между 2'-гидроксильным атомом кислорода остатка Ψ 2504 и 1-гидроксильной группой L-HisCam и мостиковой связью между атомами N^1H и N^2H остатка G2061 и карбонильным кислородом L-HisCam, а также менее прочными связями между N^3 остатка C2611 и протонированным атомом азота имидазольного цикла L-гистидилхлорамфениколамина и между N^7 остатка m^2A 2503 и N-концевой аминогруппой гистидинового остатка L-гистидилхлорамфеникола, см. таблицу 1.

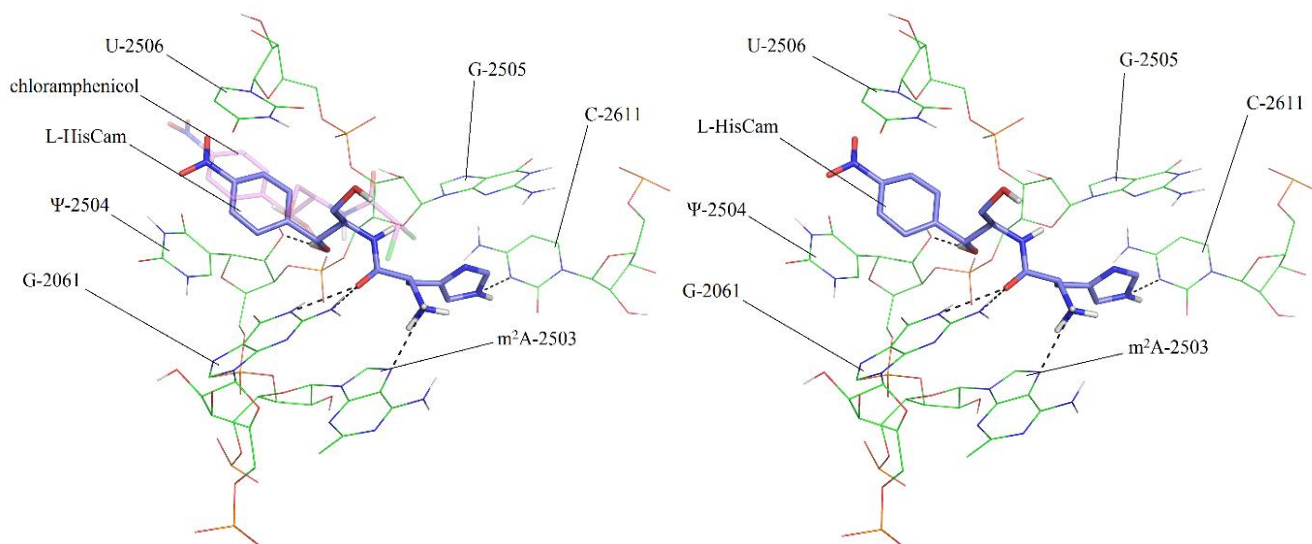


Рисунок 5 – Комплекс протонированного по атому N_{τ} L-HisCam с рибосомой *E. coli* (L-HisCam изображен синим цветом, хлорамфеникол розовым)

Помимо водородных связей, наблюдается появление гидрофобного эффекта за счёт погружения нитрофенильного фрагмента в гидрофобную полость и возникновение более стабильных стэкинг-взаимодействий с основаниями U2506 и Ψ 2504, см. таблицу 2, что влечёт за собой увеличения стабильности комплекса L-HisCam с рибосомой *E. coli*.

2.3 Комплекс протонированного по N_{τ} и N_{π} L-HisCam с рибосомой *E. coli*

Для L-гистидилхлорамфениколамина, протонированного по атомам N_{π} и N_{τ} , была рассмотрена одна конформация L-HisCam, которая образует устойчивый комплекс с рибосомой в A,A/P,P-состоянии (рисунок 6).

Эта устойчивость возникает за счёт образования прочных водородных связей между O^4 остатка U2585 и N-концевой аминогруппой гистидинового остатка L-гистидилхлорамфеникола, между 2'-гидроксильным атомом кислорода остатка Ψ 2504 и 1-гидроксильной группой L-HisCam и между 2'-кислородным атомом остатка G2505 и амидной группой L-гистидилхлорамфениколамина, а также менее прочными водородными связями между O^2 остатка U2506 и N-концевой аминогруппой гистидинового остатка L-гистидилхлорамфеникола, и между N^3H остатка U2506 и карбонильным кислородом L-HisCam, см. таблицу 1.

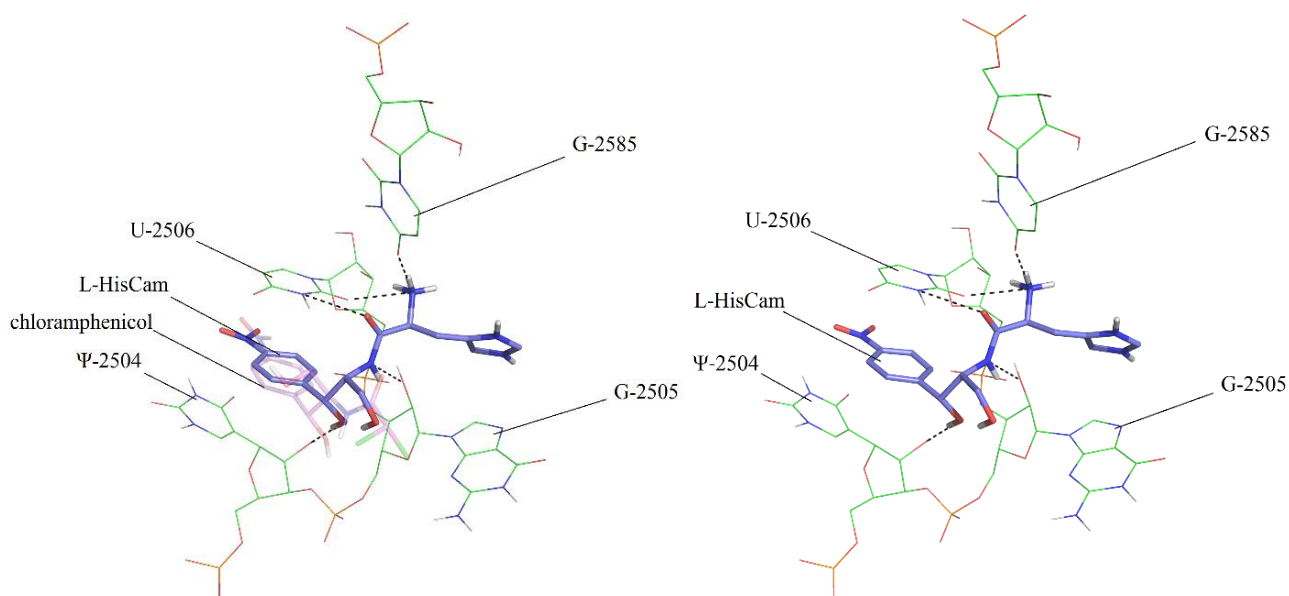


Рисунок 6 - Комплекс протонированного по N_τ и N_π ($N_\tau+N_\pi$) L-HisCam с рибосомой *E. coli* (L-HisCam изображен синим цветом, хлорамфеникол розовым)

Сродство L-гистидилхлорамфениколамина к рибосоме увеличивается за счёт увеличения стабильности стэкинг-взаимодействия между нитрофенильным фрагментом L-гистидилхлорамфениколамина и основаниями U2506 и Ψ 2504, см. таблицу 2. Как и для других вариантов протонирования L-HisCam, нитрофенильный фрагмент погружен в гидрофобную полость между основаниями U2506 и Ψ 2504, создавая гидрофобный эффект.

2.4 Сравнение различных вариантов протонирования L-HisCam

Можно полагать, что в процессе моделирования конформация фрагмента рибосомы приблизилась к оптимальной и установились характерные для того или иного варианта протонирования L-гистидилхлорамфениколамина водородные связи и стэкинг-взаимодействия. Сравним их между собой.

При всех трёх вариантах протонирования имидазольного цикла L-гистидилхлорамфениколамин удерживается в моделируемой системе стэкинг-взаимодействиями между нитрофенильным фрагментом L-гистидилхлорамфениколамина с одной стороны и основаниями U2506 и Ψ 2504

с другой стороны. Эти взаимодействия дополняются развитым гидрофобным эффектом, связанным с погружением нитрофенильного фрагмента в гидрофобную полость между основаниями U2506 и Ψ2504. Стабильность стэкинг-взаимодействия различается для разных вариантов протонирования, см. таблицу 2. Самое сильное взаимодействие наблюдается в случае L–HisCam, протонированного по атомам N_{π} и N_{τ} , далее L–HisCam, протонированный по атому N_{τ} и самое слабое стэкинг-взаимодействие наблюдается в L–HisCam, протонированном по атому N_{π} .

Мы рассчитали величину среднего количества водородных связей, обнаруженных в состоянии на заданном участке траектории. Эта величина, в сущности, говорит, сколько водородных связей удерживают антибиотик в данный момент времени. Она приведена для рассматриваемых антибиотиков в таблице 3.

Таблица 3 – Среднее число водородных связей на состояние

Протонированная форма	Среднее число водородных связей на состояние
N_{π}	3,69
N_{τ}	4,50
$N_{\pi} + N_{\tau}$	4,22

Комплекс, полученный в результате протонирования по атому N_{π} L–гистидилхлорамфениколамина, удерживается в моделируемой системе водородными связями с остатками Ψ2504 и U2506, а аминокислотный остаток L–HisCam связывается с 2'-гидроксильной группой остатка G2505 и уходит из просвета РТ, что затрудняет его взаимодействие с растущим пептидом. Это, по всей видимости, и служит причиной худшей по сравнению с хлорамфениколом способности L–HisCam ингибировать биосинтез белка.

В случае протонирования по атому N_{τ} L–HisCam образует более прочные, по сравнению с предыдущей структурой, водородные связи с остатками Ψ2504 и G2061. В этом варианте протонирования имидазольный цикл удерживается водородными связями с N^3 остатка C2611 и с N^7 остатка m^2A2503 , и уходит из просвета РТ, что также препятствует ингибированию синтеза белка.

Протонированная по атомам N_{π} и N_{τ} структура комплекса L–гистидилхлорамфениколамина с рибосомой является наиболее устойчивой из всех рассмотренных комплексов. Эта устойчивость объясняется образованием водородных связей с остатками Ψ2504, G2505 и U2506, а остаток гистидина образует прочную связь с O^4 остатка U2585, отдаляясь от растущего пептида, что также объясняет плохую способность L–HisCam ингибировать синтез белка.

Следует отметить, что только водородная связь, образованная между 2'-гидроксильным атомом кислорода остатка Ψ2504 и 1-гидроксильной группой L–HisCam встречается во всех протонированных формах, а также встречается в хлорамфениколе.

Также на прочность связывания оказывает влияние суммарный заряд полностью протонированной формы L-HisCam, поскольку рибосома состоит из отрицательно заряженных рибосомных РНК, чей заряд не уравнивается положительно заряженными рибосомными белками, так что суммарный заряд рибосомы является отрицательным. Чем больше значение положительного заряда протонированной формы L-HisCam, тем лучше удерживание.

Таким образом, устойчивость комплекса протонированного L-HisCam с рибосомой *E. coli* уменьшается в ряду:

$$N_{\tau} + N_{\pi} > N_{\tau} > N_{\pi}$$

Почему L-гистидилхлорамфениколамин подавляет синтез белка значительно хуже, чем хлорамфеникол? Природа и размер вводимого вместо дихлорацетильного остатка заместителя имеет большое значение для активности получаемого производного, поскольку именно этот заместитель взаимодействует с растущей пептидной цепью. В структуре комплекса хлорамфеникола с рибосомой положение дихлорацетильного остатка благоприятствует его взаимодействию с -2 аминокислотным остатком растущего пептида, который имеет особое значение для подавления хлорамфениколом ПТР. Напротив, остаток гистидина в L-HisCam уходит из просвета рибосомного туннеля, что препятствует его взаимодействию с растущим пептидом. Хлорамфеникол образует устойчивую водородную связь с G2061, что нельзя сказать о комплексе рибосомы с L-гистидилхлорамфеникол-амином, с которым данный остаток не образует связи и находится на большом расстоянии.

Таким образом, L-HisCam удаляется от растущего пептида и не взаимодействует с ним, но образует стабильные взаимодействия с бактериальной рибосомой. Это объясняет тот факт, что L-гистидилхлорамфениколамин не способен ингибировать биосинтез белка, но при этом хорошо связывается с бактериальной рибосомой.

3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Условия моделирования

Для моделирования молекулярной динамики и анализа полученных данных использовался пакет GROMACS 5.1.4. Остатки аминокислот и нуклеотидов моделировались с использованием силового поля parm99sb, а L-HisCam – с помощью GAFF. Оптимизированные пространственные структуры и молекулярные электростатические потенциалы остатков биополимеров и других химических соединений получались с помощью квантово-химических расчетов методом Хартри-Фока с базисом 6-31G*. Точечные заряды вычислялись в модели RESP.

Временной шаг интегрирования во всех вычислениях составлял 2 фс, координаты записывались в файл траектории каждые 200 пс. Для ограничения длин связей с атомами водорода использовался алгоритм LINCS. Моделирование выполнялось при температуре 300 К с периодом привязки 0,1 пс под управлением термостата масштабирования скоростей с добавочным стохастическим членом и периодических граничных условиях с изотропным постоянным давлением, поддерживаемым баростатом Берендсена с периодом привязки 5 пс. Электростатические взаимодействия обрабатывались посредством сети частиц Эвальда с шагом сетки 0,125 нм и четвертым порядком интерполяции. Отрицательный заряд фрагмента рибосомы был уравновешен ионами калия с оптимизированными параметрами так, чтобы вносимые ионы располагались вблизи отрицательно заряженных групп. Часть молекул воды случайным образом заменялись на ионы калия, магния и хлора с тем, чтобы препятствовать вымыванию противоионов магния и калия в водную фазу. При этом в водной фазе устанавливались концентрации $MgCl_2$ в 7 мМ и KCl в 100 мМ.

Анализ траекторий включал в себя анализ водородных связей и стэкинг-взаимодействий, а также кластеризацию методом GROMOS.

3.2 Моделируемая система

Структура комплекса рибосомы *E. coli* с fMet-тРНК в Р,Р-состоянии и мРНК была извлечена из полученной методом криоэлектронной микроскопии структуры с разрешением 2,9 Å, причем модифицированные основания, содержащиеся в 23S рРНК находились в исходной структуре. Ошибочно разрешенные основания G1847 и m5C747 были заменены на правильные A1847 и m5U747 (универсально консервативные остатки согласно банку данных). Из полученной методом рентгеноструктурного анализа структуры рибосомы *T. thermophilus* с разрешением 2,8 Å (код PDB: 4WPO) была установлена наложением аминоксил-тРНК в А,А-состоянии. Кроме того, из полученной методом криоэлектронной микроскопии структуры рибосомы *E. coli* с разрешением 7,6 Å (код PDB: 4V7D)

были добавлены наложением недостающие фрагмент G883–C893 23S рРНК и белок L1.

Конформации и положения затем были оптимизированы методом наискорейшего спуска при фиксированных остатках остальной рибосомы. Затем в построенном таким образом элонгационном комплексе, находящемся в каноническом A,A/P,P-состоянии, был компенсирован остаточный отрицательный заряд, и их положение также было оптимизировано методом наискорейшего спуска при фиксированных остатках РНК и белков и найденных в исходной структуре ионах магния. После этого элонгационный комплекс был центрирован в ромбической ячейке размером $24 \times 27 \times 25$ нм, заполненной молекулами воды и дополнительными ионами магния, калия и хлора.

Полученная система была оптимизирована последовательным применением метода наискорейшего спуска и 2 нс молекулярно-динамического моделирования при свободной воде и ионах, позиционно ограниченных C_{α} -атомах и добавленного фрагмента 23S рРНК и позиционно ограниченных (кроме водорода) атомах остальных остатков элонгационного комплекса.

Затем конформация обеих тРНК была оптимизирована последовательным применением метода наискорейшего спуска и 2 нс молекулярно-динамического моделирования, причем тРНК двигались свободно, в аминокислотных остатках, отстоящих от тРНК менее, чем на 5 Å, были позиционно ограничены C_{α} - атомы, в остальных остатках были позиционно ограничены все атомы, кроме водорода. На донорные и акцепторные атомы, формирующие водородные связи в кодон–антикодонных уотсон–криковских парах, были наложены дистанционные ограничения в 3 Å.

Наконец конформация элонгационного комплекса была оптимизирована последовательным применением метода наискорейшего спуска и 2 нс молекулярно-динамического моделирования при позиционно ограниченных C_{α} - атомах в аминокислотных остатках. После оптимизации были выделены все аминокислотные остатки и ионы K и Mg, у которых хотя бы один атом попадал в кубическую область с ребром длиной 7 нм, включающую в себя весь рибосомный туннель и ПТЦ так, что центр этой области находился в туннеле, а сам туннель пролегал вдоль мысленной оси аппликата. В полученное выделение выполняли докинг L-гистидилхлорамфеникола, применяя пакет rDock. То положение и конформация хлорамфеникола, для которого было предсказано наивысшее сродство, было установлено в описанном выше выделении. Полученная система была установлена в центре кубической ячейки с ребром 8,8 нм; полученную ячейку заполнили молекулами воды так, что грани системы были покрыты слоем растворителя в 0,9 нм. 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. Подобный подход применялся для моделирования рибосомного туннеля и не оказывает влияния на подвижность остатков рРНК, составляющих стенки рибосомного туннеля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Полученные методом моделирования молекулярной динамики комплексы L–HisCam в трёх вариантах протонирования показывают, что все они образуют устойчивое взаимодействие с рибосомой в А,А/Р,Р–состоянии. Устойчивость комплекса уменьшается в ряду:

$$N_{\tau}+N_{\pi} > N_{\tau} > N_{\pi}.$$

2. Метод молекулярной динамики позволил обнаружить, что во всех трёх вариантах протонирования остаток гистидина L–HisCam уходит из просвета рибосомного туннеля и образует связи с остатками G2505, C2611, m²A2503 и U2585, что затрудняет его взаимодействие с растущим пептидом. Это объясняет плохую способность L–HisCam ингибировать биосинтез белка.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Polacek, N. The Ribosomal Peptidyl Transferase Center: Structure, Function, Evolution, Inhibition / N. Polacek, A.S. Mankin // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2005. – V. 40, № 5. – P. 285–311.
2. Barnhill, A.E. Adverse Effects of Antimicrobials via Predictable or Idiosyncratic Inhibition of Host Mitochondrial Components / A.E. Barnhill, M.T. Brewer, S.A. Carlson // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2012. – V. 56, № 8. – P. 4046–4051.
3. Singh, R. Side Effects of Antibiotics During Bacterial Infection: Mitochondria, the Main Target in Host Cell / Rochnika Singh, L. Sripada, Rajesh Singh // *Mitochondrion*. – 2014. – V. 16. – P. 50–54.
4. Antibiotic Effects on Mitochondrial Translation and in Patients with Mitochondrial Translational Defects / C.N. Jones, C. Miller, A. Tenenbaum et al. // *Mitochondrion*. – 2009. – V. 9. – P. 429–437.
5. Ibrahim, N.G. The Sensitivity of Rat Liver and Yeast Mitochondrial Ribosomes to Inhibitors of Protein Synthesis. / N.G. Ibrahim, J.P. Burke, D.S. Beattie // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1974. – V. 249. – P. 6806–6811.
6. Lamb, A.J. The Biogenesis of Mitochondria: 4. The Differentiation of Mitochondrial and Cytoplasmic Protein Synthesizing Systems in vitro by Antibiotics // A.J. Lamb, G.D. Clark-Walker, A.W. Linnane // *Biochimica et biophysica acta*. – 1968. – V. 161, № 2. – P. 415–427.
7. Спири́н, А.С. Молекулярная биология: Структура рибосомы и биосинтез белка: учебник / А.С. Спири́н. – М: Академия, 2011. – 303 с.
8. MLA style: Albert Claude – Facts. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2019. – <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1974/claude/facts/>
9. Severo, Ochoa. Enzymatic synthesis of ribonucleic acid // Nobel Lecture. – 1959. – P. 16.
10. Schachman, H.K. Ultra centrifugation in biochemistry / H.K. Schachman. – London: Academic press, 1959. – P. 271.
11. Palade, G.E. A Small Particulate Component of the Cytoplasm / G.E. Palade // *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. – 1955. – V. 1, № 1. – P. 59–68.
12. Crystallization of 70 S Ribosomes and 30 S Ribosomal Subunits from *Thermus thermophilus* / S.D. Trakhanov, M.M. Yusupov, S.Ch. Agalarov et al. // *FEBS Lett.* – 1987. – V. 220, № 1. – P. 319–322.
13. Structure of the 30S Ribosomal Subunit / B.T. Wimberly, D.E. Brodersen, W.M. Clemons Jr. et al. // *Nature*. – 2000. – V. 407, № 6802. – P. 327–339.
14. Structure of Functionally Activated Small Ribosomal Subunit at 3.3 Å Resolution / F. Schluenzen, A. Tocilj, R. Zarivach et al. // *Cell*. – 2000. – V. 102, № 5. – P. 615–623.
15. The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution / N. Ban, P. Nissen, J. Hansen et al. // *Science*. – 2000. – V. 289, № 5481. – P. 905–920.

16. Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution / M. M. Yusupov, G.Zh. Yusupova, A. Baucom et al. // *Science*. – 2001. – V. 292, № 5518. – P. 883–896.
17. Binshtein, E. Cryo-Electron Microscopy and the Amazing Race to Atomic Resolution / E. Binshtein, M.D. Ohi // *Biochemistry*. – 2015. – V. 54, № 20. – P. 3133–3141.
18. Structure of the *E. coli* Ribosomal Termination Complex with Release Factor 2 / B.P. Klaholz, T. Pape, A.V. Zavialov et al. // *Nature*. – 2003. – V. 421. – P. 90–94.
19. Structure of the *E. coli* Ribosome – EF-Tu Complex at < 3 Å Resolution by C_s-corrected Cryo-EM / N. Fischer, P. Neumann, A.L. Konevega et al. // *Nature*. – 2015. – V. 520. – P. 567–570.
20. Mechanisms of Ribosome Stalling by SecM at Multiple Elongation Steps / J. Zhang, X. Pan, K. Yan et al. // *eLife*. – 2015. – V. 4. – P. 20–35.
21. Питерман, М. Физические и химические свойства рибосом / Мэри Питерман; пер. с англ. / под ред. Е.Ф. Романцева. – М.: Мир, 1967. – 304 с.
22. Рибосомный туннель и регуляция трансляции / А.А. Богданов, Н.В. Сумбатьян, А.В. Шишкина и др. // *Успехи биологической химии*. – 2010. – Т. 50. – С. 5–42.
23. The Geometry of the Ribosomal Polypeptide Exit Tunnel / N.R. Voss, M. Gerstein, T.A. Steitz et al. // *J. Mol. Biol.* – 2006. – V. 360, № 4. – P. 893–906.
24. Tenson, T. Regulatory Nascent Peptides in the Ribosomal Tunnel / T. Tenson, M. Ehrenberg // *Cell*. – 2002. – V. 108, № 5. – P.591–594.
25. The Ribosome as a Platform for Cotranslational Processing, Folding and Targeting of Newly Synthesized Proteins / G. Kramer, D. Boehringer, N. Ban et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2009. – V. 16. – P. 589–597.
26. Lu, J. Mapping the Electrostatic Potential Within the Ribosomal Exit Tunnel / J. Lu, W.R. Kobertz, C. Deutsch // *Journal of Molecular Biology*. – 2007. – V. 371, № 5. – P. 1378–1391.
27. Lu, J. Folding Zones Inside the Ribosomal Exit Tunnel / J. Lu, C. Deutsch // *Nature Struct. Biol.* – 2005. – V. 12. – P. 1123–1129.
28. α-Helical Nascent Polypeptide Chains Visualized Within Distinct Regions of the Ribosomal Exit Tunnel / S. Bhushan, M. Gartmann, M. Halic et al. // *Nature Struct. Biol.* – 2010. – V. 17. – P. 313–317.
29. Chloromycetin, a New Antibiotic from a Soil Actinomycete / J. Ehrlich, Q.R. Bartz, R.M. Smith et al. // *Science*. – 1947. – V. 106. – P. 417–418.
30. Weber, M. J. The Inhibition by Chloramphenicol of Nascent Protein Formation in *E. coli* / M.J. Weber, J.A. DeMoss // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1966. – V. 55, № 5. – P. 1224–1230.
31. Wilson, D. N. The A–Z of Bacterial Translation Inhibitors / D.N. Wilson // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2009. – V. 44. – P. 393–433.
32. Structural Basis for the Interaction of Antibiotics with the Peptidyl Transferase Centre in Eubacteria / F. Schlünzen, R. Zarivach, J. Harms et al. // *Nature*. – 2001. – V. 413. – P. 814–821.

33. Hansen, J.L. Structures of Five Antibiotics Bound at the Peptidyl Transferase Center of the Large Ribosomal Subunit / J. Hansen, P.B. Moore, T.A. Steitz // *Journal of Molecular Biology*. – 2003. – V. 330, № 5. – P. 1061–1075.
34. Structures of the *E. coli* Ribosome with Antibiotics Bound Near the Peptidyl Transferase Center Explain Spectra of Drug Action / A. Jack, J. Dunkle, L. Xiong et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2010. – V. 107, № 40. – P. 17152–17157.
35. Revisiting the Structures of Several Antibiotics Bound to the Bacterial Ribosome / D. Bulkley, C.A. Innis, G. Blaha et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2010. – V. 107, № 40. – P. 17158–17163.
36. Context-Specific Inhibition of Translation by Ribosomal Antibiotics Targeting the Peptidyl Transferase Centre / J. Marks, K. Kannan, E.J. Roncase et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2016. – V. 113. – P. 12150–12155.
37. Макаров, Г.И. О неканоническом взаимодействии хлорамфеникола с бактериальной рибосомой / Г.И. Макаров, Т.М. Макарова // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2018. – Т. 1862, № 12. – С. 2940–2947.
38. Binding and Action of Amino-Acid Analogs of Chloramphenicol Upon the Bacterial Ribosome / A.G. Tereshchenkov, M. Dobosz-Bartoszek, I.A. Osterman et al. // *Journal of Molecular Biology*. – 2018. – V. 430, № 6. – P. 842–852.
39. Chloramphenicol Binding Site with Analogues of Chloramphenicol and Puromycin / R. Vince, R.G. Almquist, C.L. Ritter et al. // *Antimicrob Agents Chemother*. – 1975. – V. 8. – P. 439–443.
40. The PURE System for Protein Production / Y. Shimizu, Y. Kuruma, T. Kanamori et al. // *Methods Mol Biol*. – 2014. – V. 1118. – P. 275–284.
41. Иванов, В.А. Методы компьютерного моделирования для исследования полимеров и биополимеров / В.А. Иванов, А.Л. Рабинович, А.Р. Хохлов – М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2009. – 696 с.

ABSTRACT

Kosareva K.A. A study of the interaction of L-histidinchloramphenicolamine with bacterial ribosome by molecular dynamics simulation – Chelyabinsk: SUSU, ET-431, 2019. – 38 p., 6 fig., 3 tables, 41 references.

L-histidinchloramphenicolamine, chloramphenicol, ribosome, antibiotics, molecular dynamic.

The research object is L-histidinchloramphenicolamine.

The aim of the study is the investigation of the binding of L-histidinchloramphenicolamine with the bacterial ribosome by molecular dynamic simulation.

In order to achieve the research aim the following objectives have been met:

- to compile the literature review in the research area;
- to perform docking of L-HisCam with different variants of imidazole cycle protonation in ribosomal tunnel and peptidyl-transferase center of the A,A/P,P-ribosome;
- to study the method of molecular dynamics modeling for binding of L-HisCam to *E. coli* ribosome;
- to compare the binding of different variants of L-HisCam protonation and the stability of their complexes with the *E. coli* ribosome.

The field of application includes: the obtained data can be used for further development of new antibiotics capable of inhibiting protein biosynthesis.