

**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, к.х.н., с.н.с.

_____ / Н.В. Сумбатян /

«__» _____ 2020 г.

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ

Заведующий кафедрой, д.х.н., профессор

_____ / О. К. Шарутина /

«__» _____ 2020 г.

Исследование взаимодействия радезолида с бактериальной рибосомой методами
молекулярно-динамического моделирования

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ЮУрГУ – 04.04.01. 2020. 306-086. ВКР

Руководитель, к.х.н., с.н.с
лаборатории МММФМ

_____ / Г. И. Макаров /

«__» _____ 2020 г.

Автор студент группы ЕТ – 241

_____ / Р. В. Решетникова /

«__» _____ 2020 г.

Нормоконтролер, к.х.н., доцент

_____ / О. Н. Груба /

«__» _____ 2020 г.

Челябинск 2020

РЕФЕРАТ

Решетникова Р.В. Исследование взаимодействия радезолида с бактериальной рибосомой методами молекулярно-динамического моделирования – Челябинск: ЮУрГУ, ЕТ-241, 2020. – 38 с., 4 рис., 3 табл., библиогр. список – 62 наим.

Основными объектами нашего исследования являются радезолид и бактериальная рибосома *E.coli* в каноническом А,А/Р,Р-состоянии.

Цель работы – моделирование структуры комплекса радезолида с неканоническим сайтом связывания хлорамфеникола методами молекулярной динамики.

Для достижения цели исследования были решены следующие задачи:

- проведен аналитический литературный обзор по теме исследования;
- смоделирована структура комплекса радезолида с неканоническим сайтом связывания хлорамфеникола методами молекулярной динамики;
- изучено влияния мутаций резистентности к оксазолидинонам — G2061U, G2447U, G2576U и G2505A – на связывание радезолида.;
- оценено сродство радезолида к неканоническому сайту связывания хлорамфеникола и каноническому сайту связывания линезолида методом возмущения свободной энергии.

Область применения – исследуемые объекты являются биологически активными соединениями, применимыми в качестве антибактериальных препаратов.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	
1.1 Строение и функция рибосомы	9
1.2 Оксазолидиноны	11
1.2.1 Линезолид	12
1.2.2 Радезолид	14
1.3 Метод молекулярной динамики	18
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
2.1 Моделируемая система	21
2.2 Условия моделирования	22
2.3 Методы анализа	23
3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	25
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	32
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	33
ABSTRACT	38

ВВЕДЕНИЕ

Рибосома – важнейшая органелла, синтезирующая все клеточные белки представляет большой интерес для изучения. Известно, что в ходе трансляции генетической информации она циклически принимает разнообразные конформации, соответствующие тем или иным функциональным состояниям рабочего цикла. Информация о структурных изменениях передается с помощью специфических сигналов от одного функционального центра к другому, при этом, считается, что передача осуществляется аллостерически, так как функциональные центры обычно расположены на расстоянии в несколько десятков ангстрем друг от друга [1].

В ходе трансляции, полипептидная цепь синтезируемого белка связана с рибосомой в определенной ее части, где соприкасаются малая и большая субъединицы. Рядом расположен пептидилтрансферазный центр (ПТЦ), перекрывающийся с началом рибосомного туннеля (РТ), где располагается часть синтезируемой полипептидной цепи на протяжении практически всего процесса трансляции. В ходе белкового синтеза пептидная цепь проходит через РТ вплоть до его конца, где расположены ассоциированные с рибосомой белки, что регулируют координационное сворачивание и модификацию белковой молекулы. РТ выделяется среди остальных известных на сегодняшний день каналов перемещения белков и пептидов в мембранных структурах своими физико-химическими свойствами; именно в РТ расположены многие центры связывания антибиотиков, модификация которых зачастую приводит к появлению резистентности у бактерий, в том числе и патогенных, к антибактериальным препаратам [2].

Оксазолидиноны, появившиеся сравнительно недавно антибиотики (2000 гг.) способны ингибировать синтез белка путем связывания с V доменом 23S рРНК в ПТЦ большой субъединицы рибосомы [3]. Первым представителем этого класса, запущенным в производство является линезолид, для которого Марксом с сотр была обнаружена селективность в подавлении биосинтеза пептидов в зависимости от их аминокислотной последовательности. На этом основании был изучен и смоделирован наиболее вероятный сайт связывания линезолида с рибосомой *E. coli*, находящейся в A,A/P,P-состоянии, аналогичный неканоническому сайту связывания хлорамфеникола [4].

Радезолид является перспективным представителем семейства оксазолидинонов, способным преодолевать действие некоторых механизмов резистентности бактериальных рибосом к линезолиду. Структура комплекса радезолида с рибосомой никогда не публиковалась, но, по аналогии с

линезолидом, принято считать, что этот антибиотик препятствует связыванию аминоксил-тРНК в А-сайте большой субъединицы. Но, как и в случае линезолида, можно предположить, что в А,А/Р,Р-рибосоме радезолид связывается в альтернативном сайте.

Экспериментальные методы исследования рибосомы имеют свои ограничения. Такие методы как криоэлектронная микроскопия и рентгеноструктурный анализ хотя и сообщают достаточно точные сведения о структуре рибосомы и ее лигандов, но не способны полностью передать сведения о подвижности остатков, а также структурных элементов рибосомных белков и РНК. Биохимические методы же не способны сообщить никакие сведения о структурных аспектах, хотя и позволяют изучать функционирование рибосомы.

Навести мост между биохимическими и структурными методами исследования рибосомы позволяют методы молекулярной динамики. Расчеты дают возможность оценивать подвижность остатков биополимеров рибосомы, а также интерпретировать её в категориях межмолекулярных взаимодействий. [5]

В настоящей работе мы исследовали взаимодействие радезолида с рибосомой *E. coli* в А,А/Р,Р-состоянии методами молекулярно-динамического моделирования, предложив структуру комплекса радезолида с рибосомой *E. coli*, согласующуюся с доступными данными биохимических исследований действия радезолида.

Целью нашего исследования является моделирование и изучение строения комплекса радезолида с рибосомой *E. coli* в А,А/Р,Р-состоянии.

В рамках поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести аналитический литературный обзор по теме исследования.
2. Изучить взаимодействие радезолида с неканоническим сайтом связывания хлорамфеникола методами молекулярной динамики.
3. Изучить влияние мутаций резистентности к оксазолидинонам — G2061U, G2447U, G2576U и G2505A – на связывание радезолида.
4. Оценить сродство радезолида к неканоническому сайту связывания хлорамфеникола и каноническому сайту связывания линезолида методом возмущения свободной энергии.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Строение и функция рибосомы

Рибосома - важнейшая немембранная органелла, отвечающая за биосинтез белка из аминокислот по программе, предоставляемой матричной РНК, называемый также трансляцией. Строение рибосомы изучается с 1940-х годов. Изначально рибосома была определена как неизвестная частица животной клетки, намного меньшая, чем митохондрии и лизосомы [6]. Затем методом электронной микроскопии Джордж Паладе обнаружил рибосомы в клетках крыс и куриц [7]. Участие таких частиц в биосинтезе белка доказали в конце 1950-х годов [8]. Размеры рибосом были охарактеризованы при помощи методов электронной микроскопии, однако данный метод не давал полного описания атомной структуры рибосомы. Её получение осложнялось как тем, что получение монокристаллов рибосомы было довольно сложным, так и недостаточной развитостью методов рентгеноструктурного анализа и вычислительных методов, необходимых для обработки его результатов. Только в 2000 году была построена полноатомная трехмерная модель бактериальной рибосомы [9 – 11].

И пусть у всех живых организмов рибосомы устроены схожим образом, однако следует заметить, что наличествуют различия в размерах, количестве и массе компонентов у рибосом бактерий, архей и эукариот. В данной работе обсуждается именно бактериальная 70S¹ рибосома прокариота *E. coli*. Рибосома такого типа характеризуется молекулярной массой приблизительно 2500 кДа и средним диаметром 20-25 нм, а также характерным соотношением РНК и белка, которое составляет 2:1. РНК рибосомы существует, в основном, в виде соли Mg^{2+} , причем магний может составлять до 2% сухой массы рибосомы. В водной среде рибосома представляет собой довольно компактную частицу.

Прокариотическая рибосома состоит из большой (50S) и малой субъединиц (30S). Субъединицы рибосомы объединяются только на время биосинтеза белка: малая субъединица связывает матричную РНК, затем — инициаторную аминоацил-тРНК, и в виде такого тройного комплекса соединяется с большой субъединицей. И в большой, и в малой субъединицах выделяют три сайта связывания транспортных РНК: А-сайт, связывающий приходящую аминоацил-тРНК, Р-сайт, связывающий пептидил-тРНК, и Е-сайт, в котором связывается деацилированная тРНК

1 Коэффициент седиментации, равный отношению скорости оседания частицы к ускорению, создаваемому центрифугой. Размерность этой величины — секунда, но принято измерять её в Сведбергах, S. 1S~10-13 секунд.

Малая субъединица (30S) имеет линейные размеры около 12×23 нм, морфологически в ней выделяют «тело», «голову» и «платформу», посредством которой малая субъединица взаимодействует с большой.

Большая субъединица (50S) имеет линейный размер около 20-23 нм, по форме она походит на полусферу, которая является «телом», к которой присоединены три отростка-протуберанца. С малой субъединицей большая соприкасается плоской поверхностью, находящейся на «теле». Около основания центрального протуберанца расположен доступный с поверхности пептидилтрансферазный центр (ПТЦ), от которого берет свое начало рибосомный туннель (РТ), проходя через всю большую субъединицу.

Главнейшая задача рибосомы заключается в биосинтезе белка по программе, зашифрованной в матричной РНК (мРНК), этот процесс принято называть трансляцией. При осуществлении биосинтеза белка малая субъединица отвечает за связывание мРНК и верное распознавание антикодонами аминоксил-тРНК кодонов мРНК, в то время как большая субъединица отвечает за протекание пептидилтрансферазной реакции, в ходе которой образуется новая пептидная связь.

Чтение мРНК рибосомой начинается с определенной последовательности – последовательности Шайна-Дальгарно – которая является началом её кодирующей области и обыкновенно расположена на некотором удалении от 5'-конца полинуклеотидной цепи. При узнавании этой последовательности малой субъединицей рибосомы и связывании с ней происходит инициация, начало процесса трансляции.

После стадии инициации рибосома начинает считывание кодонов мРНК по направлению к её 3'-концу, одновременно с этим происходит синтез полипептидной цепи, кодируемой мРНК. Эту стадию процесса трансляции, чтение кодирующей области мРНК, называют элонгацией.

В момент, когда рибосома встречает стоп-кодон мРНК, прекращается синтез полипептида. Далее при помощи специальных белков – факторов терминации – происходит высвобождение синтезированного полипептида из рибосомы. В дальнейшем рибосома распадается на субъединицы и высвобождает матричную РНК, чтобы вновь и вновь пройти цикл трансляции.

Как уже упоминалось выше, в большой субъединице рибосомы расположен рибосомный туннель, через который выходит синтезируемая в пептидилтрансферазном центре полипептидная сеть, образуя элементы вторичной структуры белка. Рибосомный туннель вовлечён в процессы регуляции биосинтеза белка и является мишенью многих антибиотиков, в том числе – оксазолидинонов.

1.2 Оксазолидиноны

Поиск новых антибактериальных средств в последние несколько десятилетий сосредоточен в основном на препаратах, активных против грамположительных микроорганизмов [12]. Это связано, во-первых, с высокой частотой встречаемости грамположительных инфекций и увеличением удельного веса грамположительных патогенов в этиологии госпитальных инфекций и, во-вторых, с постоянным ростом резистентности среди как госпитальных, так и амбулаторных штаммов, к наиболее проблемным из которых относятся:

- метициллин-резистентные стафилококки, выделяемые не только при госпитальных, но и при амбулаторных инфекциях;
- штаммы стафилококков со сниженной чувствительностью к гликопептидам;
- пенициллин-резистентные пневмококки;
- энтерококки (как *Enterococcus faecalis*, так и *Enterococcus faecium*), резистентные к олеандомицину.

Внебольничная пневмония является одной из основных инфекций, которая является глобальной причиной значительной заболеваемости и смертности. Успешное лечение зависит от соответствующей антибиотикотерапии, которая будет учитывать как возможные патогенные микроорганизмы, так и степень тяжести заболевания. Несмотря на то, что резистентные патогены становятся всё более распространёнными, фармацевтические компании всё ещё обсуждают рентабельность введения новых антибиотиков. Впрочем, недавно было представлено обнадеживающее количество новых молекул, которые способны побороть бактерии с множественной лекарственной устойчивостью [13].

Метициллин-резистентный золотистый стафилококк (MRSA) является частой причиной тяжелых внутрибольничных и внебольничных инфекций. С его лечением могут быть связаны различные неблагоприятные эффекты от соединений, которые обычно используются при лечении MRSA [14]. Поскольку внутриклеточные инфекции одни из наиболее трудноизлечимых: вызывающие их бактерии защищены от многих гуморальных и клеточных средств естественной защиты, а также частично защищены от действия большинства антибиотиков [15 – 19].

Оксазолидиноны представляют собой новый класс синтетических антимикробных средств, открытых в 1987 году, не связанный с каким-либо другим классом, а также проявляющий широкий спектр активности против основных и нозокомиальных грамположительных патогенов, включая MRSA, энтерококки и пневмококки [20,21]. Первый оксазолидинон, введенный в лечение, был линезолидом в 2000 году; следующий препарат – тедизолид – был одобрен в 2014 году.

В настоящее время класс представлен несколькими препаратами, находящимися на разных стадиях изучения [22]. Для клинических испытаний из двух ранних соединений линезолида и эперзолида, показавших приемлемую безопасность при доклиническом изучении, был выбран линезолид [23]. Линезолид и стал первым препаратом класса, одобренным FDA в 2000 году, позднее - в Европе и зарегистрированным в РФ под торговым названием Зивокс (Zyvox, производитель – Pharmacia).

1.2.1 Линезолид

Линезолид (рис. 1.2.1.1), проявляя антибактериальное действие ингибирует синтез белка в рибосомах бактериальной клетки, причем его действие проявляется на ранних этапах трансляции путем необратимого связывания с 30S- и 50S-субъединицей рибосом, в результате этого нарушается процесс образования 70S-комплекса и формирование пептидной цепи [24]. Данный механизм действия успешно справляется с развитием перекрестной резистентности к макролидным, аминогликозидным, линкозамидным, тетрациклиновым, стрептограминным антибиотикам, а также к хлорамфениколу. Этот уникальный механизм действия препятствует развитию перекрестной резистентности с такими антибиотиками, как макролиды, аминогликозиды, линкозамиды, тетрациклины, хлорамфеникол и стрептограминны.

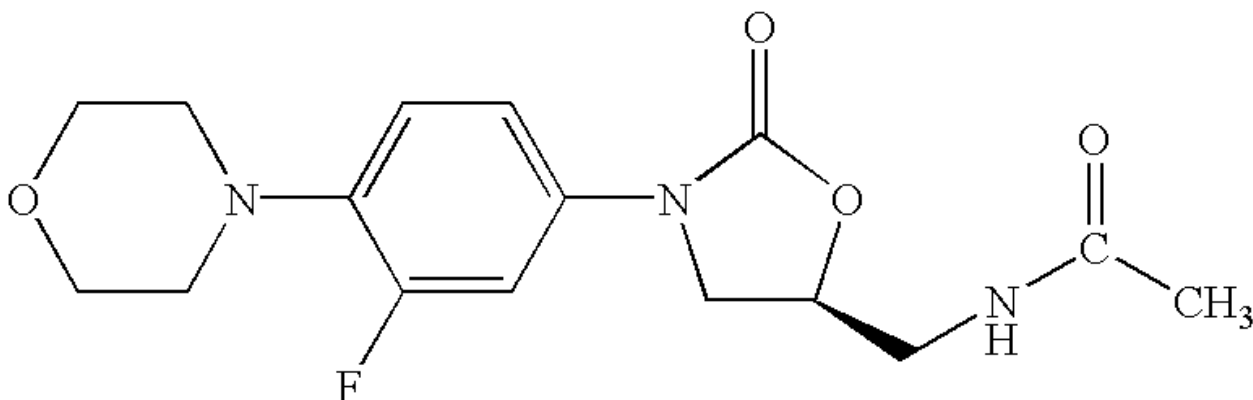


Рисунок 1.2.1.1 — Структурная формула линезолида

Относительно давно было установлено, что оксазолидиноны являются ингибиторами биосинтеза белка [21]. Конкретный механизм действия линезолида был уточнен работами [21, 25], выявившими способность линезолида подавлять инициацию трансляции. Последующие структурные исследования определили структуры комплексов линезолида с рибосомами разных бактерий [22, 26], хорошо согласующиеся друг с другом: во всех них линезолид, подобно

хлорамфениколу, взаимодействует с А–сайтом ПТЦ так, что его фторфенильный фрагмент образует стэкинг-взаимодействие с основанием А2451, морфолиновый фрагмент соприкасается с остатком рибозы U2506, а оксазолидиноновый цикл располагается вблизи Ψ2504 [24, 27]. Такое взаимодействие линезолида с рибосомой мы будем называть каноническим. Эти исследования уточнили представления о ингибировании линезолидом инициации трансляции: линезолид нарушает аккомодацию аминоацил–тРНК из А/Т– в А/А–состояние, не препятствуя связыванию fMet–тРНК в Р–сайте [28].

Также Марксом с сотрудниками [29] было исследовано действие хлорамфеникола и линезолида на ПТЦ бактериальной рибосомы как ингибиторов синтеза белка. В ходе исследования было установлено, что оба антибиотика останавливают трансляцию в определенных местах мРНК, а подавление пептидилтрансферазной реакции зависит от аминокислотной последовательности растущего пептида, например, в случае когда растущий пептид несет в своей аминокислотной последовательности остаток аланина, серин или треонин, ингибирующая способность антибиотиков становится наивысшим. Наличие в растущем пептиде такого остатка как глицин, находящийся либо на С-конце зарождающейся цепи, либо на входящей аминоацил–тРНК, напротив подавляет ингибирующее действие. Это связано с тем, что оксазолидиноновый фрагмент молекулы линезолида и дихлорацетильный фрагмент хлорамфеникола сближены со вторым с С-конца аминокислотным остатком синтезируемого пептида.

Хоть линезолид и был первым представителем оксазолидинонов и получил разрешение на продажу с 2000 года, однако, в результате его применения был зарегистрирован ряд побочных реакций, поскольку была выявлена его токсичность для митохондрий клеток человека. Это связано со сходством между митохондриальными и бактериальными рибосомами, которые могут проявляться как лактоацидоз или периферическая невропатия. Он также является слабым ингибитором моноаминоксидазы, а поэтому может усиливать действие серотонинергических и адренергических препаратов, что приводит к серотониновому синдрому. Однако уникальный механизм действия линезолида, в сочетании с его антимикробной активностью в отношении штаммов грамположительных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью делает его лекарственным средством, предназначенным для использования только в случае серьезных инфекций, для которых лечение антибиотиками, уже имеющимися на рынке, может оказаться неэффективно. Кроме того, несомненным преимуществом оксазолидинонов является их превосходная биодоступность при пероральном введении, обеспечивающая комфорт пациента. Поиск новых соединений из этой группы с хорошим профилем безопасности,

широким спектром антимикробной активности и благоприятной фармакокинетикой чрезвычайно важен.

1.2.2 Радезолид

Появляется необходимость в новых и улучшенных антибиотиках для борьбы с постоянно растущим числом бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. Модификации старых лекарств для разработки новых противобактериальных препаратов с той же мишенью что и предшественников, является успешной стратегией для преодоления бактериальной резистентности [30]. Модификация строения молекулы может улучшить свойства родительского соединения и, как правило, увеличить сродство к мутировавшим или модифицированным мишеням [31]. Например, в статье [32], посвященной поискам новых препаратов для антибактериальной терапии и обсуждению новых соединений, одно из веществ относится к классу оксазолидинонов. В этой статье представлены пять новых веществ, которые в настоящее время находятся на стадии клинических испытаний (радезолид, сутезолид, писизолид, LCB01-0371 и MRX-I). Интенсивный поиск новых антибиотиков и антибактериальных химиотерапевтических средств с эффективной антибактериальной активностью направлен на преодоление существующих механизмов резистентности для эффективной борьбы с бактериями с множественной лекарственной устойчивостью, которые представляют реальную угрозу для здоровья населения. Кризис устойчивости к антибиотикам может быть преодолен путем правильного использования этих препаратов на основе бактериологических и фармакологических знаний. Оксазолидиноны с их уникальным механизмом действия и благоприятными фармакокинетическими и фармакодинамическими параметрами представляют собой альтернативный способ эффективного лечения серьезных инфекций, вызванных грамположительными микроорганизмами.

Радезолид (R_x-1741, рис. 1.2.2.1) является новым биарилоксазолидиноновым антибактериальным средством, которое находится в клинической разработке; были завершены два клинических испытания фазы 2, первое – при неосложненных инфекциях кожи и структуры кожи (uSSSI) и второе – при внебольничной пневмонии (CAP) [15, 33, 34]. Радезолид был открыт в ходе программы R_x-01 Rib-X Pharmaceuticals, Inc., в процессе исследований была выявлена его превосходная антибактериальная активность против чувствительных к линезолиду стафилококков, энтерококков и пневмококков, а также против изолятов, устойчивых к линезолиду, особенно энтерококков и пневмококков. В отличие от линезолида, радезолид также проявлял устойчивую

антибактериальную активность в отношении возбудителей САР, таких как *Haemophilus influenzae* и *Moraxella catarrhalis*[35, 36].

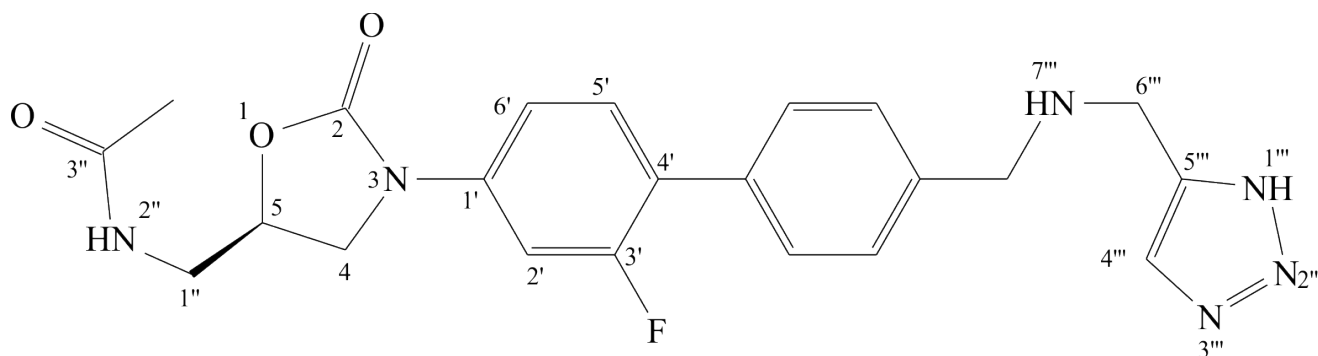


Рисунок 1.2.2.1 — Структурная формула радезолида

Действие таких оксазолидиноновых антибиотиков объясняется связыванием с высококонсервативным пептидилтрансферазным центром в рибосоме. Для разработки селективных антибиотиков требуется глубокое понимание детерминант селективности. В исследовании группы [16] впервые было выполнено технически сложное моделирование методом молекулярной динамики в сочетании с оценкой свободной энергии методом поверхности сольватации Пуассона-Больцмана (ММ-РБСА) для оксазолидинонов линезолида и радезолида, связанных с большими рибосомными субъединицами эубактерии *Deinococcus radiodurans* и археи *Haloarcula marismortui*. Была обнаружена удивительная согласованность вычисленной относительной свободной энергии связи с данными селективности, доступными из эксперимента по линезолиду [31]. Это может быть связано с тем, что оксазолидиноны и многие другие антибиотики имеют общую область перекрытия в пределах сайта связывания оснований РНК в С-кольце и части D-кольца [30, 33, 37, 38].

В исследованиях группы [40] сравнивали сродство этого семейства к большой субъединице рибосомы со сродством единственного на рынке оксазолидинонового антибиотика, линезолида, с использованием анализов конкурентного связывания хлорамфеникола и пурамицина. Конкурсные исследования показали, что некоторые соединения семейства R χ -01 вытесняют соединения, связывающиеся с А-сайтом, эффективнее, чем линезолид. Также определялось, в какой степени соединения семейства R χ -01 защищают основание U2585 (нумерация *Escherichia coli*), влияющее на образование пептидной связи и высвобождение растущего пептида, от химической модификации карбодиимидом. Оксазолидиноны R χ -01 способны ингибировать рибосомы, выделенные из

устойчивого к линезолиду *Staphylococcus aureus* в субмикромольных концентрациях, что соответствует большей антибактериальной активности в отношении устойчивых к линезолиду энтерококков. В соответствии с нацеленностью на рибосомный А-сайт и большей эффективностью, соединения R χ -01 способствуют сдвигу рамки считывания и перескоку через стоп-кодон в большей степени, чем линезолид. Важно отметить, что прирост активности не влияет на специфичность к прокариотическим рибосомам, так как, подобно линезолиду, члены семейства R χ -01 демонстрируют концентрации полуингибирования трансляции, которые по крайней мере в 100 раз выше для эукариот, чем для прокариотических рибосом. Это новое семейство оксазолидинонов отличается от линезолида тем, что обладает большей активностью в отношении штаммов, устойчивых к линезолиду, и поэтому может предложить клиницистам альтернативу для преодоления устойчивости к линезолиду [15].

После успеха линезолида немногие другие оксазолидиноны перешли в фазу II клинических исследований. Препятствия, связанные с плохой растворимостью, неприемлемой фармакокинетикой, проблемами безопасности, а также только постепенное улучшение антимикробной активности, заставили отказаться от дальнейшей разработки большинства исследуемых оксазолидинонов. Тедизолид (торезолид) и радезолид были наиболее успешными препаратами на сегодняшний день, причем отмечается их активность, в 2–4 раза большая, чем у линезолида в целом. Значения MIC₉₀ для cfr-содержащих резистентных к линезолиду изолятов *S. aureus* были в 4-8 раз ниже для радезолида и в 32 раза ниже для тедизолида по сравнению с линезолидом [15]; Радезолид, который завершил исследования фазы II (внутривенное дозирование) для CAP и неосложненного SSSI, продемонстрировал более высокую внутреннюю активность, чем линезолид в инфицированных клетках [39], при этом внутренние концентрации радезолида в фагоцитирующих клетках увеличились 11-кратность внеклеточной концентрации [15, 40].

Радезолид, также отличается от линезолида и тедизолида своим расширенным спектром антибактериальной активности, который включает грамотрицательные штаммы *Haemophilus influenzae* и *Moraxella catarrhalis* (MIC₉₀ \leq 1 мкг / мл). Группа Лоуренса определила, что активность радезолида сравнительно с линезолидом была в 16 раз выше против штаммов *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia trachomatis*, в 4 раза выше против *Legionella pneumophila* и в 2 раза выше против *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum*. Профиль противомикробной эффективности радезолида предполагает его применение при лечении острых бактериальных инфекций кожи и мягких тканей, а также внебольничной пневмонии .

Лемэйр с сотрудниками [15, 41] выявили, что радезолид быстро накапливается в макрофагах и гранулоцитах (период полувыведения и поглощения составляет 6 и 9 минут соответственно), достигая внутриклеточной концентрации, в 11 раз превышающей внеклеточную концентрацию. Это сильный, обратимый процесс, который не зависит от концентрации, но зависит от рН внутриклеточных жидкостей. Обоснование такого действия может быть связано с большим объемом распределения радезолида, который в 1,5-1,8 раза выше, чем линезолида. Это значительно улучшает проникновение в ткани и позволяет более высоким концентрациям препарата достигать очага инфекции. Кроме того, накопление в гранулоцитах и макрофагах значительно ускоряет транспорт лекарственного средства к инфекционному очагу. Радезолид можно вводить один раз в день в более низкой дозе, чем линезолид (300 или 450 мг против 600 мг), но его преимущества с точки зрения безопасности не подтвердились. Результаты IV фазы клинических испытаний после получения разрешения на продажу станут авторитетным инструментом, позволяющим провести всестороннее сравнение этих двух лекарственных препаратов.

Также изучался вопрос взаимодействия радезолида с устойчивыми к линезолиду штаммами. В статье [30] показано, что количество радезолида, накапливающегося в фагоцитирующих клетках может достигать до 11 доз, при этом 60% препарата локализуется в цитозоле и 40% в лизосомах клеток. В исследовании изучалась его активность в отношении к трем видам бактерий:

- бактерии, инфицирующие макрофаги человека ТНР-1 и заселяющие разные субклеточные компартменты (*Listeria monocytogenes*, цитозоль; *Legionella pneumophila*, вакуоли; *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*, главным образом фаголизосомные *Staphylococci*);

- *Staphylococcus aureus* с клинически значимыми механизмами устойчивости;
- изогенными, линезолид-восприимчивыми и резистентными штаммами *S. aureus*, инфицирующими ряд фагоцитирующих и нефагоцитирующих клеток.

Радезолид накапливался до сходных уровней (в 10 раз) во всех типах клеток (человеческие кератиноциты, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки бронхов, остеобласты, макрофаги и фибробласты эмбрионов крыс). При эквивалентных весовых концентрациях радезолид оказался последовательно в 10 раз более мощным, чем линезолид во всех этих моделях, независимо от вида бактерий и фенотипа резистентности или типа зараженной клетки. Это происходит из-за его более высокой внутренней активности и более высокого клеточного накопления. Кривые роста бактериальных популяций показали, что действие радезолида было более быстрым, чем действие линезолида, причём как в бульоне, так и в зараженных макрофагах. Эти данные предполагают потенциальный интерес к радезолиду как к препарату, направленному на к

рецидивирующие или персистирующие инфекции, в которых внутриклеточные очаги играют определяющую роль [42, 43].

И хотя клинические испытания радезолида успешно завершили 2 фазу для лечения неосложненных инфекций кожи и мягких органов и внебольничной пневмонии, исследования фазы 3 для оценки его переносимости еще не завершено [41, 44]. Таким образом, благодаря выраженной антибактериальной активности и преодолению резистентности некоторых штаммов по отношению к его предшественнику, радезолид представляет собой перспективный для изучения антибактериальный препарат.

Структура комплекса радезолида с рибосомой никогда не публиковалась, но, по аналогии с линезолидом, принято считать, что этот антибиотик препятствует связыванию аминокил-тРНК в А-сайте большой субъединицы. Но, как и в случае линезолида, можно предположить, что в А,А/Р,Р-рибосоме радезолид связывается в альтернативном сайте.

1.3 Метод молекулярной динамики

Метод молекулярной динамики – это метод, позволяющий рассчитывать эволюцию молекулярной системы во времени путем интегрирования уравнений движения в рамках классической механики. В классическом методе молекулярной динамики система состоит из материальных точек, движение которых подчиняется классическим уравнениям Ньютона:

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = F_i, i=1, \dots, N, \quad (1.3.1)$$

где m_i – масса молекулы, r_i – вектор положения атома, t – время, F_i – сумма сил, действующих на атом другими атомами в системе, а N – число атомов в системе, притом в самом простом случае каждая материальная точка соответствует одному атому.

Метод классической молекулярной динамики позволяет на данный момент рассматривать системы, размерами не более десятков нанометров. Такое ограничение возникает из-за ограниченной мощности современных ЭВМ. Именно поэтому метод требует ограничения моделируемой системы в рамках предложенных размеров. Вследствие этого возникает проблема искажения поведения системы, так как часть атомов находится на границе конденсированной среды и вакуума. Поэтому, классическая молекулярная динамика применяется с введением периодических граничных условий; таким образом создается система единообразных ячеек в которых ведется один и тот же расчет и частица, покидая пределы одной ячейки заменяется аналогичной из соседствующей ячейки. При этом существует ограничение, накладываемое на изначальную конформацию

моделируемой системы: в ней не может быть наложения атомов друг на друга, поскольку это может повлиять на стабильность численного интегрирования.

Большинство движений в молекулярной динамике, за исключением разве что вибраций ковалентных связей, могут быть описаны в рамках классической физики. Такая динамика реализуется, во-первых, заданием параметров, описывающих условия моделирования (температура, давление, количество атомов и т. д.), во-вторых, заданием координат атомов и распределением их начальных скоростей, в-третьих, вычислением сил и численным интегрированием уравнений движения до тех пор, пока не будет достигнут желаемый результат, и, наконец, вычислением средних значений.

Периодические граничные условия необходимы для ограничения объема системы, в случае их введения, мы получаем систему, замкнутую через противоположные границы. Как уже говорилось выше, атомы выходящие из системы, тут же входят в нее с противоположной стороны, с учетом этого расстояние между атомами вычисляется по формуле:

$$\vec{r}_{ij} = \vec{r}_j - \vec{r}_i - \left[\left(\vec{r}_j - \vec{r}_i \right) // L \right] \cdot L. \quad (1.3.2)$$

При введении таких расчетов, могут возникать проблемы с электростатическим взаимодействием, поскольку электростатический потенциал находится в зависимости от расстояния и убывает кратно $1/r$, для решения такой проблемы используют метод суммирования Эвальда на сетке. Метод заключается в том, что совокупность точечных зарядов в системе и всех ее периодических образах представляют как сумму экранированных точечных зарядов и непрерывно распределённого трёхмерно-периодического деэкранирующего потенциала. Обе этих составляющих ограничиваются только расчётной ячейкой без её периодических образов. При таком представлении электростатические силы от экранированных точечных зарядов полностью исчезают в пределах радиусов экранирования, а дальнедействующие силы, связанные с периодическим деэкранирующим потенциалом, обрабатываются с помощью быстрого дискретного преобразования Фурье. Такой подход позволяет учитывать дальнедействующие электростатические силы, затрачивая на их обработку относительно небольшой объем вычислительного ресурса.

Начальное распределение скоростей получают из распределения Максвелла-Больцмана:

$$p(v_{i,\alpha}) = \left(\frac{m}{2\pi k_B T} \right)^{\frac{1}{2}} \exp \left[-\frac{mv_{i,\alpha}^2}{2k_B T} \right], \quad (1.3.3)$$

где $v_{i,\alpha}$ – компонента ($\alpha=x,y,z$) вектора скорости для атома i , из данного соотношения также вычисляют и температуру системы через соотношение:

$$\left\langle \frac{mv_{i,\alpha}^2}{2} \right\rangle = \frac{1}{2} k_B T. \quad (1.3.4)$$

А давление рассчитывается исходя из теоремы о равномерном распределении в декартовых координатах:

$$\frac{1}{3} \left\langle r_i \frac{\partial E}{\partial r_i} \right\rangle = k_B T. \quad (1.3.5)$$

Путем математических вычислений получая:

$$P = \frac{1}{3V} \left[2 \langle K \rangle - \frac{1}{3} \left\langle \sum_i \sum_{i < j} F_{ij} r_{ji} \right\rangle \right]. \quad (1.3.6)$$

Для интегрирования уравнение движения Ньютона (1.3.1) раскладывают в ряд Тейлора, получая:

$$\vec{r}_i(t+\Delta t) = \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i(t)\Delta t + \frac{\vec{F}_i(t)}{2m}\Delta t^2 + \frac{1}{6} \frac{d^3 \vec{r}_i(t)}{dt^3} \Delta t^3 + \vec{o}(\Delta t^4). \quad (1.3.7)$$

$$\vec{r}_i(t-\Delta t) = \vec{r}_i(t) - \vec{v}_i(t)\Delta t + \frac{\vec{F}_i(t)}{2m}\Delta t^2 - \frac{1}{6} \frac{d^3 \vec{r}_i(t)}{dt^3} \Delta t^3 + \vec{o}(\Delta t^4). \quad (1.3.8)$$

Складывают получившиеся уравнения, получая:

$$\vec{r}_i(t+\Delta t) = 2\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(t-\Delta t) + \frac{\vec{F}_i(t)}{m}\Delta t^2 + \vec{o}(\Delta t^4). \quad (1.3.9)$$

А необходимые для расчета температуры и кинетической энергии скорости находят из:

$$\vec{v}_i(t) = \frac{\vec{r}_i(t+\Delta t) - \vec{r}_i(t-\Delta t)}{2\Delta t} + \vec{o}(\Delta t^2). \quad (1.3.10)$$

При таком методе интегрирования, используют силы, известные на определенный момент времени, в соответствии с этим, при изменении координат атомов, появляется необходимость заново рассчитывать силы. Такой циклический процесс является базисом для молекулярной динамики.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Моделируемая система

Структура комплекса рибосомы *E. coli* с fMet-тРНК в Р,Р-состоянии и мРНК была взята из структуры с разрешением 2.9 Å, полученной методом криоэлектронной микроскопии (код PDB: 5AFI) [40], в которой встречаются модифицированные основания в 23S рРНК согласно банку данных [45], находящиеся в структуре источника. Ошибочно разрешенные основания G1847 и m5C747 были заменены правильными A1847 и m5U747 (которые являются универсально консервативными остатками согласно банку данных [46]). Аминоацил-тРНК в А, А-состоянии помещали в комплекс путем наложения структуры рибосомы *T. thermophilus*, полученной с помощью рентгеноструктурного анализа с разрешением 2.8Å (код PDB: 4WPO) [47], где остаток фенилаланина был заменен на аланин.

Кроме того, отсутствующий фрагмент G883 – С893 23S рРНК и белок L1 были добавлены путем наложения структуры рибосомы *E. coli*, полученной с помощью криоэлектронной микроскопии с разрешением 7.6Å (код PDB: 4V7D) [46]. Конформации и положения были оптимизированы методом наискорейшего спуска с фиксированными остатками остальной части рибосомы. Далее остаточный отрицательный заряд комплекса, находящемся в каноническом А,А/Р, Р-состоянии, был компенсирован добавлением ионов калия (при оптимизации их положения также методом наискорейшего спуска с фиксированными остатками РНК и белков) и ионов магния, найденных в исходной структуре. После этого элонгационный комплекс был центрирован в ромбической ячейке с размерами 24×27×25 нм, заполненной молекулами воды и дополнительной ионами магния, калия и хлора. Полученная система была оптимизирована последовательным применением метода наискорейшего спуска и 2 нс моделирования молекулярной динамики с свободной водой и ионами, позиционно ограниченными С α -атомами и атомами фосфора белка L1 и добавленным фрагментом 23S рРНК и позиционно ограниченных (за исключением водорода) атомах прочих остатков элонгационного комплекса.

После оптимизировали методом наискорейшего спуска и 2нс молекулярно-динамическим моделированием конформацию обеих тРНК. При этом сохранялась подвижность тРНК для аминокислотных и нуклеотидных остатков, условием, что вышеуказанные отстоят от тРНК менее, чем на 5Å, а также позиционно органичивались С α -атомы и атомы фосфора белка L1, в остальных же остатках накладывали позиционное ограничение на все атомы, исключая атомы водорода.

Полученная конформация элонгационного комплекса оптимизировалась последовательным применением метода наискорейшего спуска и 2 нс молекулярно-динамического моделирования, с позиционно органиченными $\text{C}\alpha$ -атомами и атомами фосфора, соответственно аминокислотных и нуклеотидных остатков. Таким образом была получена необходимая для моделирования комплекса с радезOLIDом структура рибосомы *E.coli* в каноническом A,A/P, P-состоянии.

Для дальнейшего использования структуры выделяли все аминокислотные и нуклеотидные остатки, а также ионы K^+ и Mg^{2+} , если хотя бы один атом попадал в кубическую область с ребром в 7 нм, включающую в себя весь РТ и ПТЦ таким образом, дабы центр такой области находился в туннеле, а сам туннель пролегал вдоль мысленной оси аппликат, аналогично работе [4].

В полученный кубический фрагмент выполняли докинг радезOLIDа с использованием пакета rDock[48] при 1000 запусков оптимизационного процесса. Далее положение и конформацию радезOLIDа, для которых было предсказано наибольшее сродство к рибосоме, устанавливали в указанный выше фрагмент рибосомы. Сконструированную систему центрировали в тетрагональной ячейке размером 9.1x9.1x10 нм, так что при её заполнении водой грани фрагмента покрывались слоем растворителя не менее чем 0.9 нм. В ходе молекулярно-динамического моделирования позиционно ограничивали остатки, хотя бы один атом которых находился в 0,1 нм от грани моделируемого фрагмента рибосомы. Следует отметить, что подобный подход сохраняет локальную конформационную подвижность остатков рРНК, достаточную для установления их структурного соответствия связывающемуся лиганду.

2.2 Условия моделирования

С использованием пакета GROMACS[49] версии 5.1.4 проводили все расчеты молекулярной динамики и анализ полученных траекторий. Для моделирования канонических и модифицированных аминокислотных и нуклеотидных остатков использовали силовое поле parm99sb [50], при этом для моделирования радезOLIDа использовалось силовое поле GAFF [51]. Для получения конечных оптимизированных трехмерных структур и молекулярных электростатических потенциалов вновь параметризуемых остатков и соединений, применяли квантово-химические расчеты методом Хартри-Фока с базисом 6-31G*. Точечные заряды вычислялись в модели RESP [52].

Во всех вычислениях использовали временной шаг интегрирования в 2 фс, причем запись в файл траектории производили каждые 25 пс. Алгоритмом LINCS задавали ограничение длин связей с атомами водорода [53]. Для моделирования использовали термостат масштабирования скоростей при постоянной температуре

300 K и периодом привязки 0,1 пс, баростат Берендсена [54] с периодом привязки 5 пс применяли для поддержания изотропного постоянного давления при периодических граничных условиях. Для обработки дальнедействующих электростатических взаимодействий применяли алгоритм сети частиц Эвальда [55] с шагом сетки 0,125 нм и четвертым порядком интерполяции. В качестве растворителя использовали воду TIP4P-Ew[56]. Для компенсации остаточного отрицательного заряда системы добавляли ионы калия с оптимизированными параметрами [57], причем располагали их вблизи отрицательно заряженных групп [58] (скрипт был любезно предоставлен А. Залевским). Чтобы предупредить вымывание противоионов магния и калия в водную фазу, случайным образом заменяли часть молекул воды на ионы магния, калия и хлора, устанавливая концентрации $MgCl_2$ в 7 мМ и KCl в 100 мМ.

Для радезолида выполняли расчет уравновешенной метадинамики с обменом потенциалами с использованием пакета PLUMED версии 2.3 [59], включенного в комплекс с пакетом GROMACS версии 5.1.4. Для подстройки взвешивающего потенциала, добавляли к нему гауссовы функции высотой 2 кДж/моль с периодичностью 2500 шагов (5 пс) при взвешивающем коэффициенте 5, добиваясь достижения высоты гауссиана в 0.1 кДж/моль. В расчете использовали восемь реплик, причем взвешивающий потенциал каждой из них зависел от торсионных углов радезолида, лежащих на одинарных связях и ширина их гауссиан составляла 10 градусов. Во время моделирования было ограничено расстояние между радезолидом и остатком G2505. Анализ результатов метадинамики выполнялся так же, как и в [4].

2.3 Методы анализа

Расчёт свободных энергий связывания радезолида для смоделированных структур его комплексов с AP-рибосомой *E. coli* выполняли методом возмущения свободной энергии [60] так же, как и в [4]. При этом для сравнения использовалась структура «канонического» комплекса радезолида, полученная его докингом в канонический сайт связывания линезолида при неподвижном фторфенильном фрагменте, наложенном на канонически связанный линезолид.

Количество и протяженность траекторий приведены в таблице 1. Анализ траекторий включал в себя анализ водородных связей и стэкинг-взаимодействий и кластеризацию методом GROMOS. Также выполнялся расчёт энергий нековалентных взаимодействий.

Для анализа местонахождения и частоты встречаемости водородных связей использовали геометрический критерий, такой что водородная связь считается существующей, если атом водорода и атом-акцептор находятся на расстоянии

менее 3.5 Å, при этом угол между соединяющей атомы линией и связью между атомом-донором и его ковалентно связанным водородом меньше 30 градусов. Частота встречаемости водородной связи рассчитывалась как отношение количества кадров траектории, в которых обнаружилась данная связь, к общему количеству кадров. Стэкинг-взаимодействия также определяли по геометрическому критерию.

Расчет свободной энергии связывания ΔG_b радезолида проводили с использованием метода возмущения свободной энергии, следуя методике [61]. Соответствующей:

$$\Delta G_b = \Delta G_{\text{complex}} + \Delta G_{\text{solvent}} + \Delta G_{\text{restraint}}, \quad (2.3.1)$$

где $\Delta G_{\text{restraint}}$ вычисляется автоматически. Расчет использовал 5 окон для наложения ограничений на лиганд, 25 — для исключения электростатических взаимодействий и 20 — для исключения Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий радезолида. Каждое промежуточное состояние получали из предыдущего последовательными оптимизациями энергии методом наискорейшего спуска, 10 пс динамикой при постоянном объеме при постоянном давлении с теми же позиционными ограничениями, 2 нс динамикой при постоянном давлении и 1 нс динамикой при постоянном объеме с использованием алгоритма интегрирования стохастической динамики с перескоками.

Для обработки Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий использовалась сеть частиц Эвальда [55]. Результаты обрабатывались методом соотношений приемлемости Беннета [62].

3 Обсуждение результатов

Для отыскания структуры комплекса радезолида с рибосомой *E. coli*, пребывающей в каноническом А,А/Р,Р-состоянии мы выполнили докинг радезолида в верхний участок рибосомного туннеля и пептидилтрансферазный центр описанного выше фрагмента А,Р-рибосомы. Из полученных докингом поз радезолида были выбраны пять наиболее перспективных конформаций радезолида, имеющих наибольшее сродство к рибосоме. Каждая из них была помещена в используемый нами фрагмент А,Р-рибосомы *E. coli*, и для всех сконструированных таким образом систем было проведено моделирование короткой равновесной молекулярной динамики. Оказалось, что во всех пяти системах радезолид устойчиво взаимодействует с рибосомным туннелем и его взаимодействия сохраняются на протяжении всей траектории.

Чтобы выделить наиболее перспективную позу радезолида, мы рассчитали для всех пяти выбранных ранее поз свободную энергию связывания радезолида ΔG_b . Для сравнения мы рассчитали ΔG_b «канонической» позы радезолида, построенной наложением структуры радезолида на структуру линезолида. Выяснилось, что наиболее выгодной оказалась вторая поза, в которой триазольное кольцо занимает «гидрофобную полость» между $\Psi 2504$ и $U2506$, образуя стэкинг-взаимодействия с этими основаниями, а фторфенильный фрагмент образует стэкинг-взаимодействия с основанием $G2505$. Эта поза также превосходит «каноническую» по ΔG_b радезолида (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Свободная энергия связывания для канонической и неканонических поз радезолида, кДж/моль

Позы		ΔG_b , кДж/моль
«Каноническая» поза		-25
Позы, полученные докингом	Поза 1	-41
	Поза 2	-53
	Поза 3	-33
	Поза 4	-35
	Поза 5	-29

Позы		ΔG_b , кДж/моль
Неканонические позы	Кластер 1	-67
	Кластер 2	-81
	Гибрид 1/2	-74
	Кластер 3	-43

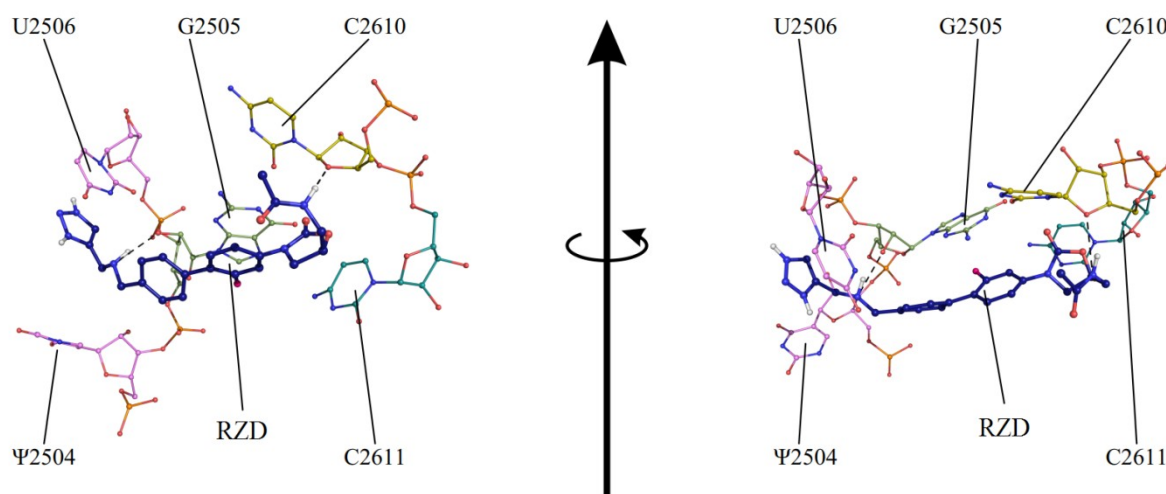


Рисунок 3.1 – Взаимодействие между радезолидом и А,А/Р,Р-рибосомой *E. coli*, смоделированное методами молекулярной динамики. Водородные связи показаны чёрным пунктиром

Чтобы уточнить выбранную выше структуру комплекса радезолида с рибосомой, принимая во внимание взаимную подстройку конформаций радезолида и окружающих его нуклеотидных остатков 23S рибосомной РНК, мы выполнили расчёт уравновешенной метадинамики с обменом потенциалами.

Мы выделили из полученного множества конформаций шесть наиболее энергетически выгодных, то есть, обладающих наиболее низкими ΔG_{conf} , структур, подобно тому, как это делалось для линезолида. Для каждой структуры была рассчитана равновесная молекулярная динамика. Полученная совокупность состояний была разделена на кластеры на основании конформации радезолида и конформаций аминокислотных и нуклеотидных остатков, удаленных от радезолида менее, чем на 1 нм, без учёта атомов водорода. При этом было

выявлено четырнадцать кластеров, к трем наиболее населенным из которых относилось 93% состояний – 69% к первому, 17% ко второму и 7% к третьему.

Для состояний, лежащих ближе всего к центрам этих трёх наиболее населенных кластеров, была рассчитана равновесная молекулярная динамика. Для полученных траекторий были проанализированы водородные связи и стэкинг-взаимодействия радезолида с нуклеотидными остатками 23S рибосомной РНК, каковой анализ и показал, что в траекториях, исходящих из центроидов первого и второго кластера, радезолид образует наиболее стабильные взаимодействия с рибосомой (таблица 3.2). Положение и конформация радезолида в этих состояниях, в целом, схожи: и в первом, и во втором кластере триазольный цикл погружен в «гидрофобную полость» между $\Psi 2504$ и $U2506$, фторфенильный фрагмент образует стэкинг-взаимодействия с основанием $G2505$, а оксазолидинольный фрагмент лежит на плоскости основания $C2611$. При этом в первом кластере триазольный цикл образует стэкинг-взаимодействия преимущественно с $\Psi 2504$, а во втором – с $U2506$, в первом кластере атом фтора ориентирован к пептидилтрансферазному центру, а во втором – в противоположную сторону. Кроме того, в первом и втором кластере различается конформация ацетамидного заместителя. При этом для первого кластера характерно более стабильное взаимодействие триазольного фрагмента с «гидрофобной полостью», чем для второго, а для второго кластера характерно более стабильное взаимодействие фторфенильного фрагмента с основанием $G2505$, чем для второго (см. таблица 3.2).

Таблица 3.2 — Встречаемости водородных связей и стэкинг-взаимодействий в основных вариантах структуры комплекса радезолида с А,А/Р,Р-рибосомой *E. coli*, % состояний

Донор	Акцептор	Кластер 1	Кластер 2	Гибрид 1/2	Кластер 3
Водородные связи					
RZD/N ₂ ''-H	C2610/O ₄ '	34	59	50	0
RZD/N ₇ ''-H	C2061/O ⁶	84	0	84	68
RZD/N ₇ ''-H	C2505/O ₂ '	0	92	0	1
RZD/N ₁ ''-H	A2453/N ¹	69	0	64	84

Донор	Акцептор	Кластер 1	Кластер 2	Гибрид 1/2	Кластер 3
Стэкинг-взаимодействия					
RZD	ψ2504	99	0	98	35
RZD	G2505	39	45	55	9
RZD	U2506	0	77	1	0

Исходя из проведенного анализа взаимодействий мы сконструировали гибридную структуру, объединяющую достоинства первого и второго кластера: в структуре первого кластера конформация ацетамидного заместителя и фторфенильного фрагмента были изменены по образцу второго кластера. Для этого гибридного состояния мы также выполнили расчёт равновесной молекулярной динамики. Анализ полученной траектории показал, что водородные связи радезолида в гибридной структуре аналогичны таковым во втором кластере, а стэкинг-взаимодействие радезолида с G2505 оказались стабильнее, чем в первом и втором кластерах при сохранении стэкинг-взаимодействия с ψ2504 (см. таблица 3.2).

Для всех четырёх вариантов структуры комплекса радезолида - первого, второго, третьего и гибридного - были рассчитаны свободные энергии связывания ΔG_b радезолида. Оказалось, что для второго кластера обладает достигаемостью наивысшее сродство радезолида к рибосоме *E. coli*, пребывающей в каноническом A,A/P,P-состоянии, а вторым по сродству к рибосоме оказывается гибридная структура (см. таблица 3.1).

Чтобы соотнести результаты наших расчётов с доступными биохимическими данными, мы выполнили моделирование систем с внесенными мутациями, ослабляющими действие оксазолидинонов. Мы выбрали мутации G2447U и G2576U, ослабляющие действие радезолида и, в большей степени, линезолида, и мутации G2505A и G2061U, которые ослабляют действие линезолида, тогда как об ослаблении ими действия радезолида сведения отсутствуют. Поскольку гибридный кластер превосходит второй кластер по стабильности взаимодействий радезолида с рибосомой при том, что второй кластер превосходит гибридный по ΔG_b радезолида, мы строили системы, несущие мутации, как на основе второго кластера, так и на основе гибридного состояния для того, чтобы дополнительно сравнить эти состояния между собой.

Анализ траекторий, полученных для мутантных систем показал, что разница в поведении радезолида между системами с мутациями G2447U и G2576U, чье

влияние на ридезолид известно, и системами с мутациями G2061U и G2505A, чье влияние на ридезолид не выявлено, больше для систем на основе второго кластера, чем для систем на основе гибридной структуры. Так, в случае мутаций G2447U и G2576U для ридезолида наблюдается более выраженное ослабление водородных связей остатком C2610 и стэкинг-взаимодействий с основаниями U2506 и G2505, чем в случае мутаций G2061U и G2505A (рисунок 3.1, таблица 3.3). Эти наблюдения позволяют окончательно утвердиться в том, что именно структура второго кластера отображает взаимодействие ридезолида с рибосомой *E. coli*, пребывающей в каноническом A,A/P,P-состоянии.

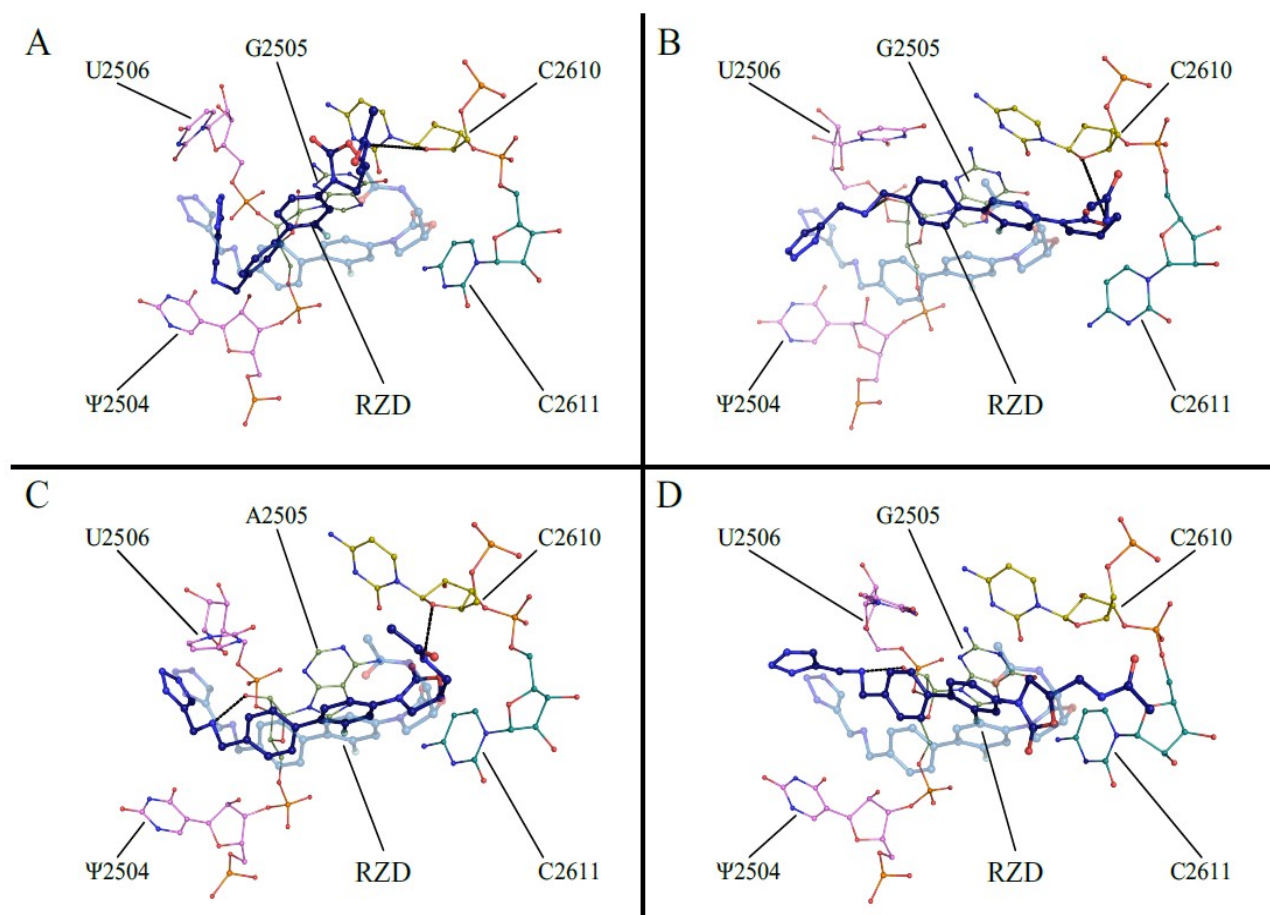
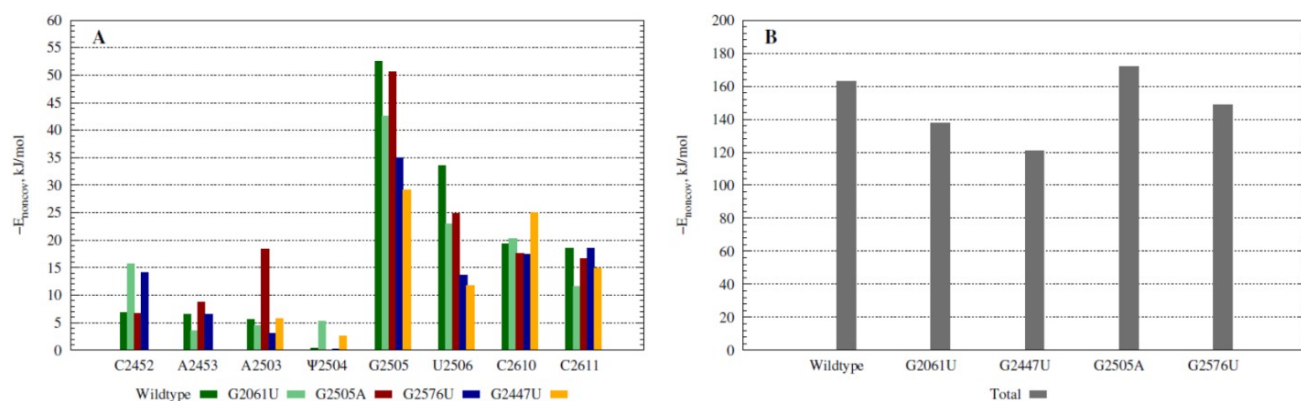


Рисунок 3.2 — Взаимодействие между ридезолидом и мутантной А,А/Р,Р-рибосомой *E. coli*, смоделированное методами молекулярной динамики.

А: мутация G2061U, В: мутация G2447U, С: мутация G2505A, D: мутация G2576U

Таблица 3.3 — Энергия нековалентных взаимодействий ридезолида и А,А/Р,Р-рибосомы *E. coli*. А: Значения E_{noncov} для ридезолида и соседних остатков 23S

рРНК; В: Значения E_{noncov} для радезолида и моделируемого фрагмента рибосомы



Известно, что радезолидкратно активнее линезолида и вдвое менее чувствителен к 2,8-диметилированию основания A2503 метилтрансферазой Cfr. Интересно интерпретировать различия этих антибиотиков во взаимодействии с бактериальной рибосомой в контексте построенных моделей их комплексов с АР-рибосомой *E. coli*. Линезолид является жёсткой молекулой с ограниченной конформационной изменчивостью. Из-за этого он, как можно заключить из выполненных нами исследований, взаимодействует с рибосомой по принципу «всё или ничего»: любое искажение сайта связывания, вызванное мутацией в 23S рРНК или адаптивной модификацией её нуклеотидных остатков, сразу же дестабилизирует все взаимодействия линезолида. Напротив, радезолид можно описать как совокупность двух жёстких элементов – триазольного и фторфенилоксазолидинонового – соединённых гибким соединителем. Каждый из жёстких элементов относительно независимо образует взаимодействия с остатками 23S рРНК, так что радезолид в целом оказывается бидентатным лигандом. Но взаимодействия этих структурных элементов радезолида с рибосомой синергичны: при ослаблении взаимодействий одного элемента взаимодействия второго сохраняются, так что радезолид удерживается в сайте связывания, так что и ослабевшие взаимодействия первого элемента не разрываются окончательно. Благодаря этой синергичности радезолид приспособляется к искажениям структуры 23S рРНК, провоцируемым мутациями и адаптивными модификациями нуклеотидных остатков. Поэтому, в частности, различия в стабильности взаимодействий радезолида между обычной и мутантными системами слабо выражены (см. таблица 3.3).

Известно, что хлорамфеникол и линезолид избирательны в подавлении трансляции в зависимости от аминокислотной последовательности растущего пептида, причем особенное значение имеет аминокислотный остаток в -2

положении. Для радезолида специфичность в подавлении трансляции не исследовали. Опираясь на предлагаемую нами структурную модель, можно предположить, что радезолид также может взаимодействовать с растущим пептидом, и, прежде всего, с его остатками в 3-5 положениях, сближающимися с биарильным фрагментом. Следует предполагать, что радезолид будет более интенсивно останавливать трансляцию в тех случаях, когда в этих положениях растущего пептида будут оказываться аминокислотные остатки с развитыми гидрофобными или ароматическими боковыми цепями, такими как лейцин или фенилаланин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы смоделировали структуру комплекса радезолида с рибосомой *E. coli*, находящейся в А,А/Р,Р-состоянии. Предлагаемая нами структура позволяет объяснить повышенную сравнительно с линезолидом антибактериальную активность радезолида, способность радезолида в известной степени нивелировать эффект 2,8-диметилирования основания А2503 метилтрансферазой Cfr и согласуется с доступными данными о влиянии мутаций в 23S рРНК на активность оксазолидинонов. Мы надеемся, что наше исследование внесет некоторый вклад в разработку этого перспективного семейства оксазолидиноновых антибиотиков.

В рамках работы были достигнуты следующие результаты.

Смоделирована структура комплекса радезолида с рибосомой *E. coli*, находящейся в А,А/Р,Р-состоянии.

Изучено строение комплекса радезолида с рибосомой *E. coli*, находящейся в А,А/Р,Р-состоянии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- 1 Изучение механизма передачи аллостерических сигналов в рибосоме методом молекулярной динамики / Г.И. Макаров, А.В. Головин, Н.В. Сумбатян и др. // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 8. – С. 1250–1261.
- 2 Рибосомный туннель и регуляция трансляции / А.А. Богданов, Н.В. Сумбатян, А.В. Шишкина и др. // Успехи биол. химии. – 2010. – Т.50. – С. 5–42.
- 3 Outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in an Italian intensive care unit / A. Mazzariol, G. Lo Cascio, E. Kocsis et al. // *Eur J Clin Microbiol Infect.* – 2012. – V.31. – P. 523–527.
- 4 Makarov, G.I. A noncanonical binding site of linezolid revealed via molecular dynamics simulations / G.I. Makarov, T.M. Makarova // *Journal of Computer-Aided Molecular Design.* – 2020. – V.34, N 3. – P. 281–291.
- 5 Investigation of ribosomes using molecular dynamics simulation methods / G.I. Makarov, T.M. Makarova, N. V. Sumbatyan et al. // *Biochemistry Moscow.* – 2016. – V. 81, N. 13. – P. 1579–1588
- 6 Спири́н, А.С. Молекулярная биология: Структура рибосомы и биосинтез белка / А.С. Спири́н. – М.: Высшая школа, 1986. — 303 с.
- 7 Palade G.E. A small particulate component of the cytoplasm / G.E. Palade // *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* – 1955. – V. 1. — P. 59–66.
- 8 Roberts R.B. Synthetic aspects of ribosomes / R.B. Roberts // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1960. – V. 88. – P. 2769–2775.
- 9 Crystal structure of the ribosome at 5.5 aresolution / M. Yusupov, G. Yusupova, A. Baucom et al. // *Science.* – 2001. –Т. 292. – С. 883-896.
- 10 The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis / P. Nissen, J. Hansen, N. Ban et al.// *Science.* – 2000. – Т. 289. – С. 920–930.
- 11 The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 aresolution / N. Ban, P. Nissen, J. Hansen et al.// *Science.* – 2000. – Т. 289. – С. 905–920.
- 12 Norrby R. Linezolid – a review of the first oxazolidinone. / R. Norrby // *Exp. Opin. Pharmacother.* – 2001. – V.2, N 2. – P. 93–302.
- 13 Distinct tRNA Accommodation Intermediates Observed on the Ribosome with the Antibiotics Hygromycin A and A201A / Y.S. Polikanov, A.L. Starosta, M.F Juette. et al. // *Mol Cell.* – 2015. – V. 58, N 5. – P. 832–844.
- 14 Liapikou A. Investigational drugs in phase I and phase II clinical trials for the treatment of community-acquired pneumonia / A. Liapikou, C. Cillóniz, A. Torres // *Expert Opinion on Investigational Drugs.* – 2017. – V. 26, N 11. – P. 1239–1248.
- 15 Cellular Pharmacodynamics of the Novel Biaryloxazolidinone Radezolid: Studies with Infected Phagocytic and Nonphagocytic cells, Using *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, and *Legionella pneumophila* /

S. Lemaire, K. Kosowska-Shick, P.C. Appelbaum et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2010. – V.54, N 6. – P. 2549–2559.

16 Determinants of the species selectivity of oxazolidinone antibiotics targeting the large ribosomal subunit / J.S. Saini, N. Homeyer, S. Fulle et al. // *Biological Chemistry*. – V. 394, N 11. – P. 1529–1541.

17 Flannagan, R.S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies / R.S. Flannagan, G. Cosío, S. Grinstein // *Nature Reviews Microbiology*. – 2009. – V. 7. – P. 355–366.

18 The basis of persistent bacterial infections / M. Rhen, S. Eriksson, M. Clements et al. // *Trends in microbiology*. – 2003. – V.11, N 2. – P. 80–86.

19 Lemaire S. Cellular Accumulation and Pharmacodynamic Evaluation of the Intracellular Activity of CEM-101, a Novel Fluoroketolide, against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Legionella pneumophila* in Human THP-1 Macrophages / S. Lemaire, F. Van Bambeke, P.M. Tulkens // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2009. – V. 53, N 9. – P. 3734–3743.

20 The Final Step of Hygromycin A Biosynthesis, Oxidation of C-5"-Dihydrohygromycin A, Is Linked to a Putative Proton Gradient-Dependent Efflux / V. Dhote, A.L. Starosta, D.N. Wilson et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2009. – V. 53, N. 12. — P. 5163–5172.

21 The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning / D.N. Wilson, F. Schlutzen, J.M. Harms // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2008. – V. 105. – P. 13339–13344.

22 Diekema D.J. Oxazolidinone antibiotics. / D.J. Diekema, R.N. Jones // *Lancet*. – 2001. – V.358. – P. 1975–1982.

23 Synthesis and antibacterial activity of U-100592 and U-100766, two oxazolidinone antibacterial agents for the potential treatment of multi-drug resistant Gram-positive bacterial infections / S.J. Brickner, D.K. Hutchinson, M.R. Barbachyn et al. // *J. Med. Chem*. – 1996. – V.39. – P. 673–679.

24 The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution / N. Ban, P. Nissen, J. Hansen et al. // *Science*. – 2000. – T. 289. – C. 905–920.

25 Brickner, S.J. Oxazolidinone antibacterial agents. Detailed review of the discovery and development of the whole oxazolidinone class, including information on synthesis and structure-activity relationships / S.J. Brickner // *Current Pharmaceutical Design*. – 1996. – V. 2, N 2. – P. 175–194.

26 Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: in vitro and in vivo activities of DuP 105 and DuP 721 / A.M. Slee, M.A. Wuonola, R.J. McRipley et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1987. – V. 31, N 11. – P. 1791–1797.

27 Wilson, D.N. The A-Z of bacterial translation inhibitors / D.N. Wilson // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. – 2009. – V. 44, N. 6. – P. 393–433.

28 Crystal structure of the oxazolidinone antibiotic linezolid bound to the 50S ribosomal subunit / J.A. Ippolito, Z.F. Kanyo, D. Wang // *J Med Chem.* – 2008. – V. 51, N 12. – P. 3353–3356.

29 Context-specific inhibition of translation by ribosomal antibiotics targeting the peptidyl transferase center / J. Marks, K. Kannan, E.J. Roncase et al. // *PNAS.* – V. 113, N. 43. – P. 12150–12155.

30 Wilson, D. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance / D. Wilson // *Nat Rev Microbiol.* – 2014. – V. 12. – P. 35–48.

31 Design and synthesis of biaryloxazolidinone derivatives containing a rhodanine or thiohydantoin moiety as novel antibacterial agents against Gram-positive bacteria / Y. Wu, X. Ding, S. Xu et al. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* – 2019. – V. 29, N 3. – P. 496–502.

32 Karpiuk I. Looking for the new preparations for antibacterial therapy. V. New antimicrobial agents from the oxazolidinones groups in clinical trials / I. Karpiuk, S. Tyski // *Przegl Epidemiol.* – 2017. – V.71, N.2. – P. 207–219.

33 R χ -01, a New Family of Oxazolidinones That Overcome Ribosome-Based Linezolid Resistance / E. Skripkin, T.S. McConnell, J. DeVito et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2008. – V.5, N 10. – P. 3550–3557.

34 Tedizolid: A Novel Oxazolidinone with Potent Activity Against Multidrug-Resistant Gram-Positive Pathogens / G.G. Zhanel, R. Love, H. Adam et al. // *Drugs.* – 2015. – V. 75, N 3. – P. 253–270.

35 Application of spectroscopic methods (FT-IR, Raman, ECD and NMR) in studies of identification and optical purity of radezolid / K. Michalska, E. Gruba, M. Mizera et al. // *Spectrochimica Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* – 2017. – V.183. – P.116–122.

36 Recent development of potent analogues of oxazolidinone antibacterial agents / K. Michalska, I. Karpiuk, M. Król et al. // *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* – 2013. – V.2, N 3. – P. 577–591.

37 Design at the atomic level: Design of biaryloxazolidinones as potent orally active antibiotics / J. Zhou, A. Bhattacharjee, S. Chen et al. // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.* – 2008. – V.18, N 23. – P. 6175–6178.

38 Design at the atomic level: Generation of novel hybrid biaryloxazolidinones as promising new antibiotics / Zhou, A. Bhattacharjee, S. Chen et al. // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.* – 2008. – V.18, N 23. – P. 6179–6183.

39 Bush, K. Improving known classes of antibiotics: An optimistic approach for the future / K. Bush // *Current Opinion in Pharmacology.* – 2012. – V.12, N 5. – P. 527–534.

40 The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools / C.Quast, E. Pruesse, P. Yilmaz et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2013.–T. 41, № D1. – C. D590—D596.

41 Structure of the *E. coli* ribosome–EF–Tu complex at < 3 Å resolution by Cs–corrected cryo–EM / N. Fischer, P. Neumann, A.L. Konevega // *Nature.* – 2015. – V. 520. – P. 567–570.

42 Bassetti M. Safety profiles of old and new antimicrobials for the treatment of MRSA infections / M. Bassetti, E. Righi // *Expert Opinion on Drug Safety.*– 2016. – V. 15, N 4. – P. 467–481.

43 Shaw, K.J. The oxazolidinones: Past, present, and future / K.J. Shaw, M.R. Barbachyn // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 2011. – V. 1241, N 1. – P. 48–70.

44 The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs / J. Cannone, S. Subramanian, M.N. Schnare // *BMC Bioinformatics.* – 2002. – V. 3,N 1. – P. 1–31.

45 Conformational changes of elongation factor G on the ribosome during tRNA translocation / J.Lin, M.G. Gagnon, D. Bulkley et al. // *Cell.* – 2015. –T. 160. –C. 219–227.

46 Structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the pretranslocation state / A.F. Brilot, A.A. Korostelev, D.N. Ermolenko // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2013. –V. 110, N 52. –P. 20994–20999.

47 Side-chain recognition and gating in the ribosome exit tunnel / P.Petrone, C. Snow, D. Lucent et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2008. –V. 105, N 43. –P. 16549–16554.

48 rDock: a fast, versatile and open source program for docking ligands to proteins and nucleic acids / S.Ruiz-Carmona, D. Alvarez-Garcia, N. Foloppe et al. // *PLoS Comput Biol.* – 2014. – V.10, N 4. – e1003571.

49 GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation / D.Spoel, E. Lindahl, B. Hess et al. // *J. Chem. Theory Comput.* – 2008. – T.4. – C. 43–5447.

50 Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters / V.Hornak, R. Abel, A. Okur et al. // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* – 2006. – V. 65, N 3. – P. 712—725.

51 Development and testing of a general amber force field / J.Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell et al. // *J. Comput. Chem.* – 2004. –V.25. –P.1157–1174.

52 Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies, and free energies of solvation / W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly et al. // *J. Am. Chem. Soc.* –1993. – V. 115, N. 21. – P. 9620–9631.

53 Hess, B. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations / B.Hess, H. Bekker, H.J.C. Berendsen et al. // J. Comput. Chem. – 1997. –V. 18,N 12. –P. 1463–1472.

54 Molecular dynamics with coupling to an external bath / H. Berendsen, J. Postma, W. Gunsteren et al. // J. Chem. Phys. – 1984. –V. 81. –P. 3684–3690.

55 Darden, T. Particle mesh Ewald: an $Nl(N)$ method for Ewald sums in large systems / T. Darden, D. York, L. Pedersen // J. Chem. Phys. – 1993. –V. 98. –P. 10089–10092.

56 Hans, W.H. Characterization of the TIP4P-Ew water model: Vapor pressure and boiling point / W.H. Hans, C.S. William, W.P. Jed // Journal of Chemical Physics. – 2005. – V. 123. – P. 194–204.

57 Joung, I.S. Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations / I.S. Joung, T.E. Cheatham // J. Phys. Chem. B. – 2008. – V.112, N 30. – P. 9020–9041.

58 RNA folding and catalysis mediated by iron (II) / S. Athavale, A. Petrov, C. Hsiao et al.// Plos One. – 2012. – V. 7. – P.1–7.

59 PLUMED 2: new feathers for an old bird / G.A. Tribello, M. Bonomi, D. Branduardi et al. // Comput. Phys. Commun. – 2014. – V. 185, N 2. – P. 604–613.

60 Absolute binding free energies: A quantitative approach for their calculation / S. Boresch, F. Tettinger, M. Leitgeb // Journal of Physical Chemistry B. – 2003. – V.107, N 35. – P. 9535–9551.

61 Lennard–Jones lattice summation in bilayer simulations has critical effects on surface tension and lipid properties / C.L. Wennberg, T. Murtola, B. Hess et al. // J. Chem. Theory Comput. – 2013. – V. 9, N 8. – P. 3527–3537.

62 Bennett, C.H. Efficient estimation of free energy differences from monte carlo data / C.H. Bennett// J. Comput. Phys. – 1976. – V. 22, N 2. – P. 245–268.

ABSTRACT

Reshetnikova R.V. Investigation of radezolid interaction with the bacterial ribosome by molecular dynamics simulations – Chelyabinsk: SUSU, ET-241, 2020. – 38 p., 43 fig. 7 table, 37 references.

The main objects of our research are radezolid and bacterial A,A/P/P-ribosome of *E. coli*.

The aim of the study of modeling the structure of radezolid complex with the noncanonical binding site of chloramphenicol by molecular dynamics simulations.

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

- to compile the analytical literature review in the research area;
- to obtained by molecular dynamics simulation methods the most probable structure of the radezolid complex with a *E. coli* ribosome in the A,A/P,P-state;
- to examined the effect of oxazolidinone resistance mutations – G2061U, G2447U, G2576U и G2505A – to radezolid bindings;
- to estimated the radezolid affinity for the noncanonical chloramphenicol binding site and the canonical linezolid binding site by the free energy perturbation method.

Field of application includes: the studied objects are biologically active compounds used as antibacterial agents.