

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. кафедры химии природных соединений Химического Факультета МГУ им М.В.Ломоносова, к.х.н.

_____ / Н.В.Сумбатьян/
«__» _____ 20__ г.

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ

Заведующий кафедрой, д.х.н.

Профессор

_____ / О.К.Шарутина/
«__» _____ 20__ г.

Изучение взаимодействия
онкоцин–десмикозиновых конъюгатов с рибосомой методом молекулярно-динамического моделирования

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА ЮУрГУ – 04.03.01.2020.

НОМЕР СТУДАК ВКР

Руководитель, с.н.с., к.х.н.

_____ / Г.И.Макаров /
«__» _____ 20__ г.

Руководитель, м.н.с.

_____ / Т.М.Макарова /
«__» _____ 20__ г.

Автор

студент группы ЕТ – 431

_____ / О.С.Брагина /
«__» _____ 20__ г.

Нормоконтролер, доцент

_____ / О.Н.Груба /
«__» _____ 20__ г.

Челябинск 2020

РЕФЕРАТ

Брагина О.С. Изучение взаимодействия онкоцин–десмикозиновых конъюгатов с рибосомой методом молекулярно–динамического моделирования– Челябинск: ЮУрГУ, ЕТ-431, 2020. – 40 с., 7 ил., 6 табл., библиогр. список – 31 наим.

Десмикозин, онкоцин, онкоцин-десмикозиновые конъюгаты, рибосома, антибиотики, молекулярная динамика.

Объектом исследования является онкоцин-десмикозиновые конъюгаты.

Цель работы – изучение связывания онкоцин-десмикозинового конъюгата и ацилированного онкоцин-десмикозинового конъюгата с бактериальной рибосомой методом моделирования молекулярной динамики

Для достижения цели исследования решены следующие задачи:

- проведен литературный обзор по проблеме исследования;
- выполнен докинг онкоцина и ацилированного десмикозина;
- выбраны оптимальные позы ацилированных онкоцин-десмикозиновых конъюгатов, которые наиболее правдоподобно отражали расположение конъюгата внутри рибосомального туннеля;
- методом моделирования молекулярной динамики изучено связывание конъюгатов с рибосомой *E. coli*;
- проведено сравнение связывания свободных онкоцина и десмикозина, а также их конъюгатов. По данным молекулярной динамики можно судить о стабильности образовавшихся комплексов онкоцин-десмикозин.

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

Оглавление

Оглавление	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Рибосома	9
1.1.1 История рибосом	9
1.1.2 Строение и функции рибосом	10
1.1.3 Синтез белка	12
1.1.4 Рибосомный туннель	14
1.1.5 Ингибиторы	16
1.2 Метод молекулярной динамики	19
1.2.1 Основные принципы	19
1.2.2 Численное интегрирование уравнений движения	24
1.2.3 Расчёт физических параметров моделируемой системы	26
3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	29
3.1 Условия моделирования	29
3.2 Моделируемая система	29
4 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	31
4.1 Сравнение взаимодействия конъюгатов и десмикозина с рибосомой	31
4.2 Сравнение взаимодействия конъюгатов и онкоцина с рибосомой	33
4.3 Сравнение	35
5 ВЫВОДЫ	37
АВСТРАКТ	38
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	39

ВВЕДЕНИЕ

АИФ-здоровье как-то подсчитало, что за год человек, который, в основном, сидит дома болеет 5-6 раз в год, а люди, ведущие активный образ жизни, могут болеть около 10 раз за год. Возбудителями болезни могут быть вирусы или бактерии. И, если наиболее эффективным средством борьбы с большинством вирусов человека остается вакцинопрофилактика и сыворотки, то для борьбы с болезнетворными бактериями человечество располагает эффективным оружием - – антибиотиками.

Существует большое количество антибиотиков, различной структуры и направленности их действия. Например, тилозин, десмикозин и макроцин проникают через мембрану в клетку с помощью пассивного транспорта. Мишенью примерно половины всех антибиотиков является рибосома. Она является чрезвычайно выгодной мишенью антибиотиков, поскольку, во-первых, реализует чрезвычайно важную клеточную функцию, и во-вторых, крайне консервативна, чтобы приобретать полную резистентность за счёт множественных мутаций и существенных изменений сайтов связывания [1]. Связываясь с различными функциональными центрами рибосомы или фиксируя определённую конформацию, в которой рибосома не может связываться с другими лигандами, рибосомные антибиотики так или иначе подавляют и нарушают процесс нормального биосинтеза клеточных белков, что приводит к остановке роста бактерии и даже гибели клетки. Тем не менее, устойчивость к рибосомным антибиотикам всё же развивается, что заставляет отыскивать новые антибиотики и исследовать механизмы действия известных антибактериальных соединений, надеясь с помощью полученных знаний обойти механизмы устойчивости.

Недавно учёные из МГУ им. М.В. Ломоносова синтезировали новое пептидное производное макролидного антибиотика десмикозина, которое, показав более чем умеренную способность связываться с бактериальной рибосомой, не оправдало их ожиданий. Это вещество конструировалось как конъюгат макролидного антибиотика десмикозина, соединённого через остаток γ -аминомасляной кислоты с N-концевым участком антибактериального пептида онкоцина. Мы решились исследовать то, как это соединение может взаимодействовать с рибосомным туннелем, методами молекулярно-динамического моделирования.

Задачей настоящей работы является сравнительное изучение взаимодействия антибиотика десмикозина, пептида онкоцина, и десмикозин-онкоцинового конъюгата, ацилированного и неацилированного, с рибосомой *E. coli* методами молеку-

лярно-динамического моделирования. Это исследование ставит себе целью объяснить причины пониженной активности ацилированного конъюгата сравнительно с исходным антибиотиком.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Рибосома

1.1.1 История рибосом

В 1940г. Альбертом Клодом были открыты гранулы, содержащие молекулы РНК, позже они приобрели название – макросомы. Исследования макросом активно велись до 1959г. различными группами ученых. Итогом плодотворной работы стали следующие сведения о этих органеллах: форма – сфера диаметром около 100-200Å, природа частиц –рибонуклеопротеиды, локализуются они на эндоплазматической сети либо в свободном виде в цитоплазме, основная функция – синтез белка [2,3].

Следующим шагом было определение именно строения рибосом, к этому вопросу вернулись только в 1970-е годы. В это время была открыта первичная структура компонентов трансляционного аппарата. На рубеже десятилетий *E. coli* стала первооткрывательницей среди клеточных органелл, так как у неё первой смогли описать РНК и белковые компоненты. Полное описание рибосомной РНК стало возможным после введения новых методов секвенирования. Новые технологии рекомбинантной ДНК помогли построить детальную генетическую карту компонентов, участвующих в биосинтезе белка. Так же за эти годы были установлены механизмы транскрипции и регуляции трансляционной обратной связи с использованием различных биохимических, биофизических, биологических методов: пересборка рибосом *in vitro*, локализация рибосомных компонентов *in situ* с помощью иммуноэлектронной микроскопии, исследования малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и др. Данные исследования привели ученых к выводу, что данная органелла имеет четвертичную структуру. 1980-е годы ознаменованы возможностью моделирования всех структур органеллы, но особо значимое открытие – существование третьего сайта связывания транспортной РНК. 1990-е годы принесли плоды двадцатилетних трудов: воссоздание структур больших рибосомных единиц с атомным разрешением.

Параллельно развитие криоэлектронной микроскопии (или просвечивающей электронной микроскопии при криогенных температурах) помогло уточнить общую форму рибосомных частиц, в том числе, находящихся в конкретных функциональных состояниях. Таким образом формируется динамическая картина элонгации трансляции. Осведомленность об участии рибосомных РНК в функционировании рибосомы выросла за последние десятилетия. Основополагающим в этом кон-

тексте был, безусловно, Карл Во́зе с его предположениями о происхождении механизма синтеза белка. Но именно описание каталитической активности рибосомной РНК, начатое Томасом Чехом, опровергла «белковую парадигму» функционирования рибосомы, распространенную в 1960-х и 1970-х годах, восстановив обратно «РНК-парадигму» (действительно, в первые дни рибосомологии рибосомные РНК тесно связывались с рибосомной функцией.) Накапливались признаки того, что 23S РНК участвует в пептидотрансферной реакции, которая до этого предполагалась областью действия рибосомных белков. Впрочем, усилия по выявлению пептидилтрансферной активности чистой рибосомой РНК долго не достигали успеха. Полноатомная структурная модель большой субъединицы предполагает, что рибосомная РНК действительно может катализировать пептидилтрансферную реакцию без прямого участия белков. С этой точки зрения рибосома оказалась настоящим рибозимом. Но получение прямых биохимических данных о каталитическом механизме реакции переноса растущего пептида на аминокислотную группу вновь приносимой аминокислоты остается задачей на будущее [4].

1.1.2 Строение и функции рибосом

Выделяют рибосомы двух видов: 80S – рибосомы находятся в цитоплазме эукариот, 70S – в митохондриях, пластидах и цитоплазме прокариот. Теперь подробнее разберем структуру рибосомы. Во-первых, рибосома не является монолитной она состоит из двух частиц, большой (50S) и малой (30S) субъединиц, хотя биоинженерам удалось разработать гибридную рибосому, в состав которой входит единая молекула РНК вместо двух длинных цепочек рРНК, такое строение обеспечивает неделимость органеллы [5]. Но вернемся к субъединицам, как понятно из названия, субъединицы отличаются размерами, но также есть отличия и в составе: малая субъединица включает в себя рРНК размером 16-18S и 21-35 белков, а большая субъединица включает в себя остальные рибонуклеиновые кислоты и 34-45 белков (таблица 1.1).

Таблица 1.1. – Содержание субъединиц рибосомы

	Малая субъединица			Большая субъединица		
	Седимент.	рРНК	Белков	Седимент.	рРНК	Белков
Прокариоты	30S	16S рРНК	21	50S	23S и 5S рРНК	34
Эукариоты	40S	18S рРНК	30-35	60S	28S и 5,8SpРНК	40-45

Белки, входящие в состав большой и малой субъединиц рибосомы, требуют более подробного рассказа. Прокариотическая рибосома содержит около 50 белков. Рибосомные белки чаще всего обладают основными свойствами, т.к. в их составе содержится довольно большое количество лизина и аргинина. Название основных белков строится по двум параметрам. Первый это расположение пятен белков на двумерных электрофореграммах в системе, чем тяжелее белок и чем в меньшей мере он проявляет основные свойства, тем его номер меньше и наоборот. Второй параметр есть нахождение белков, если белок находится в малой субъединице, то он обозначается буквой S, если в большой субъединице - то буквой L. Все в мире развивается и обнаружение новых белков в рибосоме так же не стоит на месте. Например, белок RACK1 в 60S субъединице и белок PS1D в 30S субъединице описаны только в 1999 г. и 2002 г. соответственно [6].

Обычно субъединицы не соединены в одно целое, это происходит только во время синтеза белка. Субъединицы имеют различные функции: малая субъединица связывает мРНК и отвечает за связывание аминокислотных транспортных РНК, чьи антикодоны соответствуют кодонам мРНК; большая субъединица присоединяется к сформированному комплексу 30S•мРНК•аминоацил-тРНК, завершая сборку рибосомы. Большая субъединица отвечает за образование новой пептидной связи — пептидилтрансферазную реакцию, вывод синтезируемого пептида в цитоплазму и регуляцию его синтеза.

Во-вторых, в состав рибосом эукариотической клетки входят четыре вида рРНК, различающиеся количеством нуклеотидов (таблица 1.2.) [7].

Таблица 1.2 – Длины рибосомных РНК в нуклеотидных остатках.

Субъединица	Эукариоты		Прокариоты	
	Коэффициент седиментации	Нуклеотидных остатков	Коэффициент седиментации	Нуклеотидных остатков
Большая субъединица	28S	4800	23S	4800
	5,8S	160	5S	120
Малая субъединица	18S	1900	16S	950

1.1.3 Синтез белка

Основной задачей рибосом является биосинтез белка (трансляция), которые протекает в несколько этапов. Стоит уточнить, что под этапами биосинтеза мы подразумеваем только этапы трансляции. Трансляция – процесс синтеза белка из аминокислот по программе, записанной в матричной РНК, который осуществляется рибосомой.

Процесс трансляции у прокариота включает три основных этапа: [8]

1 этап: инициация трансляции. Суть данного этапа заключается в образовании рибосомы, готовой к началу синтеза белка. В начале малая субъединица связывается с белковым фактором IF3, затем данный комплекс образует связь с инициаторной формилметионил-тРНК^{fMet}. Благодаря участию инициаторных факторов первого рода IF1 и IF2 данная конструкция дает нам иницирующий комплекс 30S.

Фактор иницирования IF2 проходит через малую субъединицу, касается С – концом акцепторного стебля иницирующей тРНК. Исследованиями было доказано, что иницирующий фактор IF1 уже отсутствует в конечном комплексе.

Запуск транскрипции напоминает пазл: как только правильно собранная комбинация дает нам возможность увидеть картину полностью, так и в трансляция начинается только после того, как инициаторная аминоксил-тРНК связывается с определенным кодоном, т.н. стартовым кодом в Р-сайте.

2 этап: элонгация. Элонгация – процесс, который выполняется за определенное количество циклов, она завершается, как только в А-сайт попадает стоп-кодон. Единичный цикл элонгации заключается в следующем:

1. Р-сайты большой и малой субъединиц занимает тРНК, к акцепторному стеблю которой прикреплена наращиваемая пептидная цепь, А-сайт при этом свободен.
2. К элонгационному комплексу присоединяется аминоксил-тРНК, доставляющая очередную аминокислоту. Она занимает А-сайты большой и малой субъединиц, связываясь своей антикодоновой петлей с очередным кодоном мРНК.

3. Аминогруппа нового аминокислотного остатка атакует сложноэфирную связь между растущим пептидом и акцепторным стеблем пептидил-тРНК, образуя новую пептидную связь – пептидилтрансферазная реакция.
4. Элонгационный фактор G за счёт энергии гидролиза ГТФ катализирует транслокацию, то есть перемещение бывшей аминоацил, а теперь пептидил-тРНК в Р-сайты, а бывшей пептидил-тРНК, теперь опустевшей, в Е-сайты.
5. Опустевшая тРНК покидает рибосому, которая становится готовой к новому циклу элонгации.

Как только в А-сайт попадает стоп-кодон, элонгация заканчивается, данная пептидная цепь перестает расти и запускается последний этап – терминация.

3 этап: терминация. Как же происходит узнавания стоп-кодона? Для этого есть специальные факторы первого класса RF1 и RF2, данный процесс является селективным, за распознавание стоп-кодонов отвечают определённые структурные мотивы в факторах элонгации. (таблица 1.2)

Таблица 1.2 – Селективность процесса терминации

Фактор	Стоп-кодон			Мотив	
	UAA	UAG	UGA	Pro-X-Thr,	Ser-Pro-Phe
RF1	+	+		+	
RF2	+		+		+

Такое связывание отражается на конформации оснований G530, A1492 и A1493: A1493 укладывается на A1913 23S рРНК, G530 на третье основание стоп-кодона. За счёт данных преобразований, которые сместили основание U2585, входящее в состав пептидилтрансферазного центра, сложноэфирная связь между пептидом и тРНК открывается для нуклеофильной атаки. Механизм гидролиза до конца не выяснен, есть информация о том, что амидная группа глутамина из мотива GGQ способна образовывать водородные связи с 3'-гидроксильной группой остатка A76 деацилированной тРНК, являющейся продуктом гидролиза. Так же есть предположение, что глутамин образует водородные связи с 2'-гидроксильной группой A76 и тем самым направляет молекулу воды на сложноэфирную связь [9].

Затем фактор терминации RF3 связывается с комплексом рибосомы и фактором терминации первого рода, тем самым обеспечивая быстрый выброс ГДФ. После выброса, ГДФ связывается с RF3, при этом изменяется конформация ГДФ, что приводит к уходу факторов терминации первого рода и более сильному связыванию ГДФ и рибосомы [10]. После этого происходит диссоциация большой и малой субъединиц с высвобождением мРНК и тРНК.

1.1.4 Рибосомный туннель

К 1970г были установлены основные этапы, главные участники и базовые принципы процесса биосинтеза белка. Так как рибосомный туннель является одним из главных участников данного процесса, он не был обделен вниманием. История рибосомного туннеля начинается в конце 1960-х – начале 1970-х, когда несколько групп исследователей независимо друг от друга обнаружили, что С-концевые районы синтезируемых на рибосоме белков длиной примерно 30-40 аминокислотных остатков не подвергались расщеплению протеолитическими ферментами. Этот феномен был истолкован тем образом, что защищённые от протеолиза участки растущей пептидной цепи скрываются в некоем канале, содержащемся в структуре рибосомы. После данного открытия вопрос о рибосомном туннеле не поднимался на протяжении 12 лет, вновь заинтересовался данным районом рибосом Лейк и его сотрудники. Окончательно существование рибосомного туннеля было доказано воссозданием пространственной структуры рибосомы методами рентгеноструктурного анализа (рисунок 1.1).

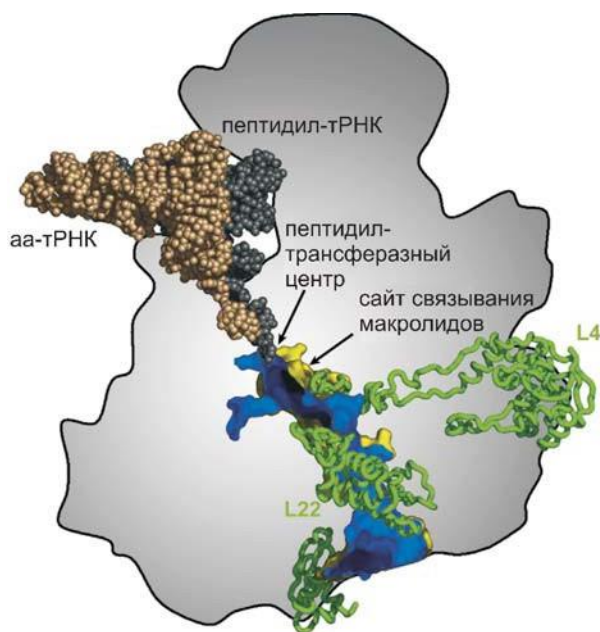


Рисунок 1.1 – Рибосомный туннель в большой субъединице

Почему рибосомный туннель вызывает неизменный интерес сообщества исследователей рибосомы? Тому есть несколько неоспоримых причин. Во-первых, индивидуальность этой структуры, ведь рибосомный туннель (РТ) принципиально отличается от других биологических каналов своими свойствами. Во-вторых, сайты связывания многих рибосомных антибиотиков находятся именно в рибосомном туннеле, поэтому модификация его приводит к устойчивости бактерий к антибиотикам. Изучение взаимодействия рибосомного туннеля с антибиотиками открывает возможность разработки новых антибактериальных препаратов. В-третьих, РТ вовлечен в процессы контроля синтеза белков, его стенки отслеживают аминокислотную последовательность перемещающегося вдоль них олигопептида.

Уникальность рибосомного туннеля кроется в его строении: его внутренняя поверхность и прилегающие к ней области рибосомы большей своей частью сложены из нуклеотидных остатков 23S рибосомной РНК и только около двух-трех сегментов рибосомных белков. Напротив, все, за исключением одного примера [11,12], каналы, поры, осуществляющие транспорт различных частиц и веществ, а также макромолекулярные комплексы, имеют белковую природу. Структуру РТ слагают нуклеотидные остатки пяти из шести доменов [13] 23S рибосомной РНК.

Гетероциклические основания остатков рРНК, выстилающие рибосомный туннель обращены внутрь, что помогает образовывать водородные связи и гидрофобные контакты с продвигающейся по туннелю полипептидной цепью. Так как движение большинства последовательностей аминокислот не затруднено, можно сделать вывод о том, что на поверхности РТ отсутствуют длинные гидрофильные или гидрофобные зоны. В РТ находится большое количество сайтов, которые связываются с антибиотиками. Мутации в них вызывают устойчивость бактерий к антибактериальным препаратам.

РТ сильно гидратирован, он, будто нитками, сшивается с поверхностью большой субъединицей небольшими каналами, через которые проходит вода и гидратированные ионы. Как показывают данные молекулярной динамики, вода не хаотично расположена в РТ, а имеет небольшое упорядочивание и пониженный коэффициент диффузии [14].

РТ условно можно разбить на несколько частей:

1. От остатка U2620 до остатков G2057, A2058, A2059, A2503, A2061, A2062 – сайт связывания макролидов и антибиотиков

2. Остатки L4 и L22 образуют сужение РТ до 1нм. В данном отрезке туннеля содержатся гидрофобные незаряженные группы
3. Остатки I и III доменов 23S рРНК образуют туннель диаметром 2,5нм.
4. Глобулярная часть белка L22, белки L24, L29 и L32 это последняя часть туннеля, которая оканчивается выходом , имеющий воронкообразную форму[15].

1.1.5 Ингибиторы

1.1.5.1 Макролиды

Рибосомы – это заводы по производству белка; в условиях войн за место в экологической нише, которые ведут между собой бактерии, на любом заводе могут появиться диверсанты. В нашем случае роль диверсантов выполняют рибосомные антибиотики, видное место среди которых занимают макролиды, которые препятствуют нормальному синтезу белка. Макролиды обладают антибиотической или противогрибковой активностью и используются в качестве фармацевтических препаратов, считаются одними из самых безопасных из доступных антибиотиков, причем распространенность гиперчувствительности к лекарственным препаратам составляет от 0,4% до 3% от всех видов лечения [16].

Макролиды представляют собой класс природных и полусинтетических продуктов, сходных по строению с эритромицином (рисунок 1.2).

Макролиды различаются строением большого макроциклического лактона и его заместителей, как правило, углеводной природы. Например, в эритромицине это кладиноза и аминоксахар дезозамин. Лактоновые кольца обычно 12- – 16-членные, макролиды делятся по размеру кольца на 3 группы: 14- , 15-, 16-членные.

Несмотря на различное строение, антибактериальное действие макролидов в целом сходное и заключается в следующем. Молекула макролида связывается с рибосомным туннелем и пептидилтрансферазным центром 50S субъединицы рибосомы, модифицируя чувствительность рибосомного туннеля к проходящей по нему растущей пептидной цепи. Из-за этого значительная часть синтезируемых аминокислотных последовательностей задерживается рибосомным туннелем, так что синтез образуемых ими белков обрывается, завершаясь отщеплением пептидил-тРНК от рибосомы [17]. Это приводит к нарушению метаболизма бактериальной клетки и её гибели. Впрочем, некоторые макролиды, такие, как тилозин, способны

полностью перекрыть доступ приносимых аминокислот в А-сайт и, таким образом, полностью остановить протекание пептидилтрансферазной реакции.

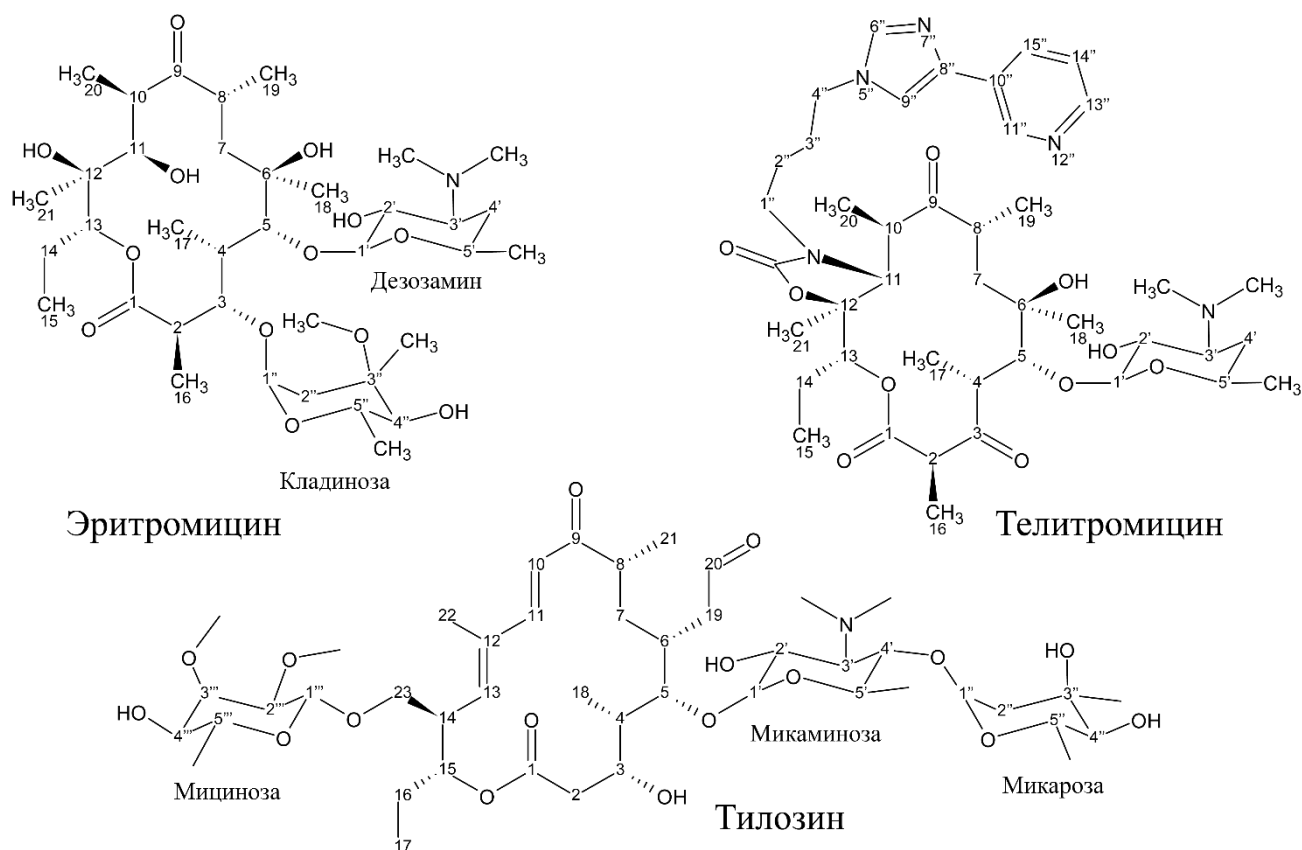


Рисунок 1.2 – Структуры некоторых известных макролидов

Связывание макролидов может произойти на любой стадии трансляции [18]. Макролиды могут конкурировать с другими группами антибиотиков, взаимодействующих с большой субъединицей рибосомы, такими как линкозамиды, стрептограммины и хлорамфеникол. Это приводит к взаимному ослаблению их действия [19].

1.1.5.2 Онкоцин и другие бактериальные пептиды

Хотя большинство антибактериальных пептидов повреждает мембрану бактериальной клетки, пролин-богатые пептиды имеют совершенно другой механизм антибактериального действия. Изначально считалось, что действие данных ингибиторов заключалось в нарушении процесса сворачивания белка. Данное предположение выдвигалось на том основании, что пролин-богатые пептиды взаимодействуют с шапероном DnaK. Впоследствии выяснили, что механизм действия данных пептидов заключается в том, что, например, принадлежащий к этому классу

пептид проникает в клетку, не нарушая целостности мембран, и связывается в рибосомном туннеле, нарушая процесс элонгации или терминации, в зависимости от природы антибактериального пептида [20].

В состав пролин-богатых пептидов входит большое количество остатков пролина и аргинина. Пролин-богатые пептиды выступают в роли главных защитников членистоногих и даже млекопитающих от микробов извне [20]. Действие ингибиторов является индивидуальным для каждой мишени, например, хорошо действуют на грамотрицательную у *E. coli*, но практически не влияют на грамположительную *B. subtilis*. Это явление объясняется наличием у грамотрицательных бактерий транспортерных белков SbmA и YjiL-MdtM [20].

Наиболее изученные онкоцин-подобные пептиды – это онкоцин и Onc112, производные природного пролин-богатого пептида жука *Oncopeltus fasciatus*, а также Vas7(1-16), обрезанный с С-конца природный пептид бактенецин-7, продуцируемый коровой. При взаимодействии онкоцина с туннелем его пространственное расположение достаточно интересно. N-конец пептида располагается в ПТЦ, в то время как С-конец направлен к выходу из туннеля. Действие онкоцина на бактериальную клетку основано на том, что его N-концевой участок перекрывается с ССА-концом тРНК, тем самым препятствуя переходу от инициации к элонгации, при этом Р-сайт способен связываться с тРНК [21,22].

1.2 Метод молекулярной динамики

1.2.1 Основные принципы

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

Развитие метода молекулярной динамики (МД) началось в 1950х годах [23]. Изначально данный метод разрабатывался для решения задач в области физики конденсированного состояния, но в скором времени его основным полем применения стали физико-химическая биология и химия высокомолекулярных соединений.

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

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

Где 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. Положение любой частицы $r_i(t)$ и её скорость $v_i(t)$ изменяется за время h незначительно и с учетом закона (1) записываются в виде (2) и (3):

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

$$r_i(t + h) \approx r_i(t) + h v_i(t) \quad (3)$$

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 $g_i(h)$ 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. Данные уравнения помогают проследить за поведением молекулярной системы, которая удовлетворяет нашим координатам, дополнительный бонус, если мы знаем координаты точек, это позволяет нам вывести графическое изображение на экран и следить за тепловым движением молекул, которое происходит за счет их взаимодействия.

Уравнения классической механики Ньютона (1) описывают динамическое поведение системы взаимодействующих материальных точек, состояние которой полностью описывается координатами и скоростями всех частиц. При движении такой системы её полная энергия, импульс и момент импульса сохраняются. В ходе своей эволюции она приходит к некоему равновесному состоянию, в котором её кинетическая и потенциальная энергии флуктуируют около своих средних значений, являющихся функциями полной энергии. Если число частиц в системе достаточно велико, то её состояние естественно характеризовать её температурой. По координатам частиц в расчётной ячейке легко восстанавливаются их периодические образы 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.

Пусть $U=U(r_1, \dots, r_N)$ обозначает собой потенциальную энергию моделируемой молекулярной системы, причём эта функция полностью отражает взаимодействие между частицами. Тогда сила F_i , действующая на i -ю частицу, получается дифференцированием U по соответствующим координатам частицы согласно формуле (5):

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

При молекулярно-механическом описании моделируемой атомно-молекулярной системы потенциальную энергию атомно-молекулярной системы обычно представляют суммой аналитически заданных потенциалов, связанных с тем или иным аспектом поведения системы: энергией колебаний валентных связей, валентных углов, торсионных углов, описывающих конформационное вращение вокруг свя-

зей, энергией деформации плоских групп, таких, как бензольные кольца или гуанидиновые фрагменты, ван-дер-ваальсовых и кулоновских взаимодействий. Вид и параметры этих потенциалов могут выбираться из различных соображений. Обычно стараются добиться более точного воспроизведения структурных параметров моделируемой системы, известных из эксперимента (спектральные и дифракционные измерения) или квантово-химических расчётов, а так же макроскопических физико-химических свойств, таких, как плотность, температуры и энтальпии фазовых переходов, и т.п. Совокупность выбранных потенциалов и их параметров, используемых для создания молекулярно-механической модели атомно-молекулярной системы, называют силовым полем. Наиболее известные силовые поля, применяемые для молекулярно-динамического моделирования — AMBER, CHARMM, GROMOS, DREIDING, OPLS, MM2, MM3, MM4.

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

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

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 Леннард-Джонса;

U_{qq} — потенциал кулоновской энергии заряженных частиц.

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

$$U_{\text{валентных связей}} = \sum_i K_{l,i} \quad (7)$$

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.

$$U_{\text{валентных углов}} = \sum_i K_{\theta,i} \quad (8)$$

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.

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

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.

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

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 Леннард-Джонса по формуле (11):

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

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 $[R_{on}, R_{off}]$, которая вычисляется по формуле (12):

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

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):

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

(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.

2.2.2 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 $a(t) = F_i(t)/m_i$ – 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 четвертого порядка по h и выше.

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

$$X(t|0 + h) = 2X(t_0) - X(t_0 - h) + a(t_0)h^2 + O(h^4) \quad (20)$$

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 $t = h$: $r_i(h) = r_i(0) + h v_i(0)$. 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 10⁶ 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 вычисляются со сдвигом на половину шага интегрирования. 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 вся

процедура расчёта координат и скоростей снова 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 схемы (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 уравнениях (28–29) выразить скорости через координаты, используя вторую строку, то после элементарных преобразований придём к соотношению (24). Немного сложнее вывести соотношение (24) из уравнений (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.

2.2.3 Расчёт физических параметров моделируемой системы

Температура в модельной молекулярной системе (мгновенная и средняя по траектории) определяется через среднюю кинетическую энергию, приходящуюся на одну степень свободы и вычисляется по формуле (30):

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

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 есть соответствующая скорость, то есть усредняемый член равен удвоенной компоненте кинетической энергии по данной обобщенной координате определяется по формуле (31):

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

где K_k – кинетическая энергия.

Система, содержащая N частиц, имеет $s = 3N - 6$ внутренних степеней свободы (исключены смещение и вращение системы как целого). Температуру можно рассчитать, суммируя компоненты кинетической энергии, соответствующие внутренним степеням свободы, предполагая при этом, что моделируемая система совершает малые поступательные движения и вращения (32):

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

Если система изолирована, то она характеризуется постоянной полной энергией, так что её среднюю температуру можно рассчитать из средней кинетической энергии. С другой стороны, есть проблема с мгновенной температурой, которая может меняться на протяжении всей траектории из-за того, что энергия системы будет перераспределяться из потенциальной в кинетическую, увеличивая последнюю. Постоянство мгновенной температуры системы поддерживают на уровне t_{ref} , если требуется, используя специальные алгоритмы термостатирования, регулярно приводящие мгновенную температуру системы к заданной, тем или иным образом изменяя скорости частиц.

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

Если молекулярная система заключена в какой-то объем, 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):

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

Где S – площадь поверхности, t_{calc} – время усреднения [24].

3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Условия моделирования

Все расчеты молекулярной динамики и анализ полученных траекторий проводились с использованием пакета GROMACS версии 5.1.4. Канонические и модифицированные аминокислотные остатки моделировались с использованием силового поля parm99sb. При этом оптимизированные трехмерные структуры и молекулярные электростатические потенциалы вновь параметризуемых остатков и соединений получались квантово-химическими расчетами методом Хартри-Фока с базисом 6-31G*. Точечные заряды вычислялись в модели RESP.

Временной шаг интегрирования во всех вычислениях составлял 2 фс, координаты записывались в файл траектории каждые 25 пс, продолжительность каждой траектории составляла 200 нс. 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. Остаточный отрицательный заряд системы был компенсирован ионами калия с оптимизированными параметрами, причем добавляемые ионы располагались вблизи отрицательно заряженных групп.

Анализ получившейся системы включал в себя анализ водородных связей и стэкинг-взаимодействий, а именно их вероятность и характер, энергии (Ван-Дер-Ваальсово и электростатическое взаимодействия) а также кластеризацию методом GROMOS.

3.2 Моделируемая система

Все моделируемые системы строились на основе кубического фрагмента рибосомы *E. coli*, сконструированном в работе [25] и восходящем к полученной методом рентгеноструктурного анализа структуре с разрешением 3.1Å (код PDB: 4V7U) [26], в 23S рибосомную РНК которой следуя банку данных [27] были добавлены модифицированные нуклеотидные остатки. Кубический фрагмент рибосомы имел ребро около 10 нм и включал в себя весь рибосомный туннель и пептидилтрансферазный центр таким образом, что рибосомный туннель приблизительно совпадал с осью этого фрагмента, вытянутой вдоль мысленной оси аппликат. По-

добный подход был использован в работах [28, 29]. В полученное выделение устанавливали десмикозин, накладывая на него структуру комплекса рибосомы *H. marismortui* с тилозином, имеющую разрешение 3.0Å (код PDB: 1K9M) [26], и удаляя из установленной структуры тилозина остаток микарозы. В ходе молекулярно-динамического моделирования существовала ковалентная связь между атомом C20 десмикозина и экзоциклической аминогруппой основания A2062.

При моделировании комплекса онкоцина с рибосомой *E. coli* в то же выделение устанавливали онкоцин, накладывая на него структуру комплекса онкоцина с рибосомой *T. thermophilus*, имеющую разрешение 2.9Å (код PDB: 4Z8C) [26].

При моделировании конъюгата онкоцин-десмикозинового конъюгата начальное состояние структуры его комплекса с рибосомой *E. coli* получали, накладывая на описанную выше структуру комплекса десмикозина N-концевой шестичленный пептид ¹VDKPPY⁶ из указанной выше структуры комплекса онкоцина. При этом остаток γ-аминомасляной кислоты, соединяющий десмикозин и онкоциновую части конъюгата, был смоделирован с помощью программы PyMOL на основании остатков Leu-7 и Pro-8. В ходе молекулярно-динамического моделирования существовала ковалентная связь между атомом C20 десмикозин-онкоцинового конъюгата и экзоциклической аминогруппой основания A2062.

При моделировании ацилированного конъюгата ацетильные группы вводились на 2'-гидроксильную группу остатка микаминозы и 4'''-гидроксильную группу остатка мицинозы. Конформацию десмикозиновой части ацилированного конъюгата и остатка γ-аминомасляной кислоты в сайте связывания искали докинггом, применяя пакет rDock [30], сохраняя при этом положение, ориентацию и конформацию N-концевого гексапептида ¹VDKPPY⁶ неизменными. Четыре модели, показавшие наивысшее сродство к рибосоме, были выбраны для дальнейшего молекулярно-динамического моделирования. Ковалентная связь между атомом C20 ацилированного десмикозин-онкоцинового конъюгата и экзоциклической аминогруппой основания A2062 для этих моделей не вводилась в силу большого взаимного удаления потенциальных реакционных центров [31]. В наших расчетах были приняты следующие сокращения Des – десмикозин, Onc – онкоцин, OD – онкоцин - десмикозин-онкоциновый конъюгат, AcOD – ацилированный онкоцин-десмикозин-онкоциновый конъюгат и далее указывается номер позы.

4 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было проведено сравнение взаимодействия рибосомного туннеля бактериальной рибосомы *E.coli* онкоцином, десмикозином и конъюгатом десмикозина с шестичленным N-концевым доменом онкоцина, неацилированным или дважды ацилированным по углеводным остаткам десмикозина. Для ацилированного конъюгата мы отобрали четыре основных модели.

4.1 Сравнение взаимодействия конъюгатов и десмикозина с рибосомой

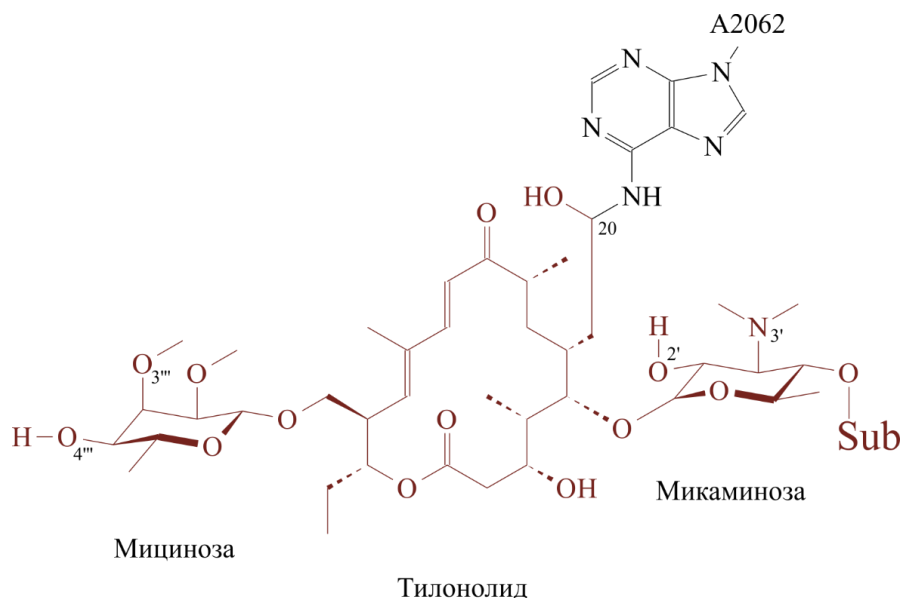


Рисунок 4.1 – Структура антибиотика десмикозина и конъюгата с онкоцином на его основе. Десмикозин: Sub=H. Конъюгат: Sub= ¹VDKPPY⁶-ГАМК.

Таблица 4.1 – Сравнение устойчивости водородных связей десмикозина и десмикозиновых частей онкоцин-десмикозиновых конъюгатов.

Водородная связь		Встречаемость, % состояний					
Донор	Акцептор	AcDO13	AcDO21	AcDO27	AcDO48	Des	DO
Мициноза/O _{4'''} -H	A-751/O _{2'}	0	0	0	0	74	68
Мициноза/O _{4'''} -H	G-748/O ⁶	0	0	0	0	88	76
Микаминоза/N _{3'} -H	G-2505/O ⁴	0	0	0	0	73	1
Микаминоза/O _{2'} -H	A-2058/N ¹	0	0	0	0	94	51
A-2062/N ⁶ -H	Тилонолид/O ₂₀	0	23	0	43	0	0
G-2505/N ² -H	Микаминоза/O _{2'}	0	52	0	0	0	0
G-748/N ¹ -H	Мициноза/O _{3'''}	0	0	0	0	97	83

По данным таблицы 4.1 видно, что молекула десмикозина и онкоцин-десмикозинового конъюгата соединяется прочными водородными связями между гидроксильными группами мицинозы и нуклеотидными остатками G-748 и A-751 и между 2'-гидроксильной группой микаминозы и остатком A-2058. Исключение составляет водородная связь между 3'-аминогруппой микаминозы и остатком G-2505, вероятность появления которой у десмикозина в 70 раз больше, чем у онкоцин-десмикозинового конъюгата. Особое внимание привлекают модели ацилированного конъюгата, в которых десмикозиновая часть образует невоспроизводимо хаотичные и малостабильные водородные связи, которые не встречались ни в десмикозине, ни в онкоцин-десмикозиневом конъюгате. Причиной данного эффекта может быть то, что ацилированный десмикозин-онкоциновый конъюгат во всех этих моделях не смог найти оптимальное расположение в пространстве рибосомного туннеля из-за ацетильных групп, стерически не позволяющих установить водородные связи, характерные для 16-членных макролидов.

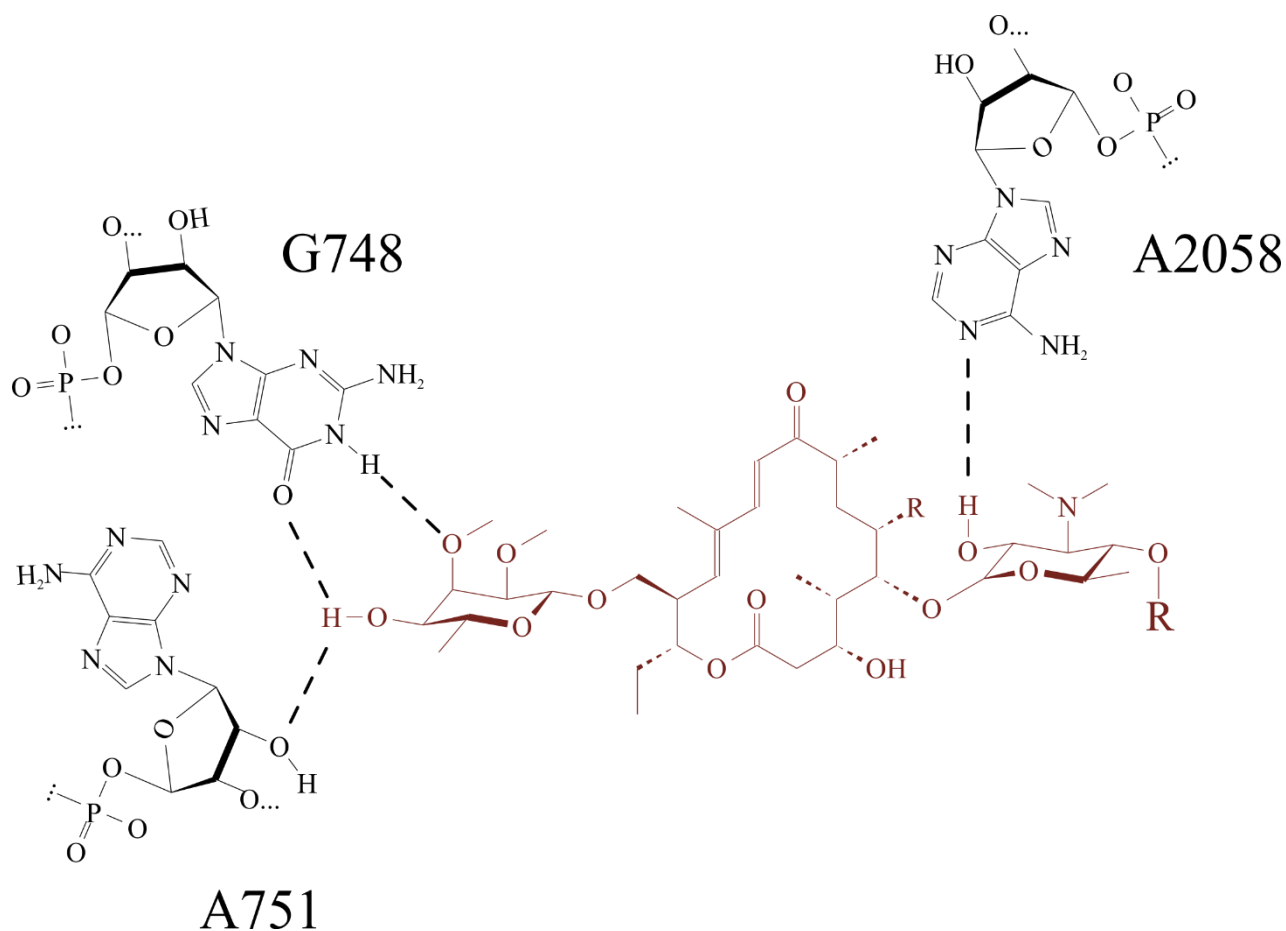


Рисунок 4.2 – Наиболее устойчивые водородные связи антибиотика десмикозина и десмикозиновой части конъюгата с остатками рибосомного туннеля

4.2 Сравнение взаимодействия конъюгатов и онкоцина с рибосомой

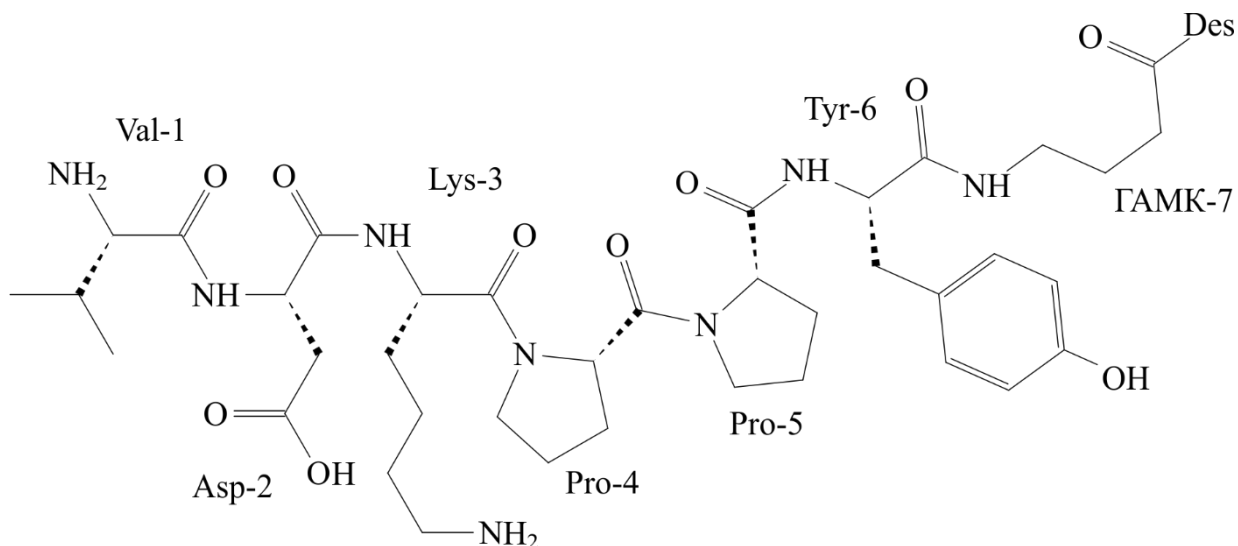


Рисунок 4.3 – Онкоциновая часть конъюгата

Таблица 4.2 – Сравнение устойчивости водородных связей конъюгатов и онкоцина

Водородная связь		Встречаемость, % состояний					
Донор	Акцептор	AcDO13	AcDO21	AcDO27	AcDO48	Onc	DO
ГAMK-7/N _γ -H	U-2585/O ⁴	41	2	0	0	0	0
Lys-3/N _ε -H	C-2452/O _{фосф}	9	6	1	0	1	35
Lys-3/N _ε -H	C-2573/O _{2'}	0	0	31	0	0	0
Lys-3/N _ε -H	G-2508/O _{фосф}	0	0	41	0	21	0
Tyr-6/N-H	U-2506/O _{2'}	0	0	0	0	82	0
Tyr-6/O ₄ -H	U-2506/O _{фосф}	5	0	0	0	0	41
Val-1/N-H	C-2452/O _{фосф}	0	0	0	48	0	0
Val-1/N-H	C-2573/N ³	0	61	0	0	0	0
Val-1/N-H	G-2494/O _{фосф}	3	0	0	32	0	0
C-2573/N ⁴ -H	Val-1/O	0	64	0	0	0	0
G-2061/N ² -H	Tyr-6/O	0	0	0	2	2	70
G-2553/N ¹ -H	Asp-2/O _δ	0	0	0	0	45	0
G-2553/N ¹ -H	Asp-2/O _{δ'}	0	0	1	0	40	0
G-2553/N ² -H	Asp-2/O _{δ''}	0	0	0	0	45	0
U-2584/N ³ -H	ГAMK-7/O	0	0	89	0	0	0
Стэкинг- взаимодействия							
Tyr-6	C-2452	1	0	14	2	0	41

Как видно из таблицы 4.2, в образовании водородных связей участвуют остаток онкоцина Tyr-6 и Asp-2 с остатками U-2506 и G-2553 соответственно, онкоциндесмикозиновый конъюгат образует водородные связи между участками остатками онкоциновой части Lys-3 и Tyr-6 с остатками C-2452 и G-2061 соответственно. Изменение водородных связей между онкоцином и его фрагментом, входящим в конъюгат, можно объяснить стерическим фактором: образующая ковалентную

связь с основанием A2062 десмикозиновая часть конъюгата смещает к себе онкоциновую, отчего её водородные связи и перераспределяются сравнительно с целым онкоцином. По данным таблицы снова видно, что ацилированный конъюгат образует водородные связи хаотично, так что выявить какую-либо закономерность нельзя.

Стабильность стэкинг-взаимодействия таблица 4.2 различается для разных вариантов соединений. Самое сильное взаимодействие наблюдается в случае онкоцин-десмикозинового конъюгата, далее ацилированный онкоцин-десмикозиновый конъюгат в позе 27, в остальных случаях это стэкинг-взаимодействие можно считать отсутствующим.

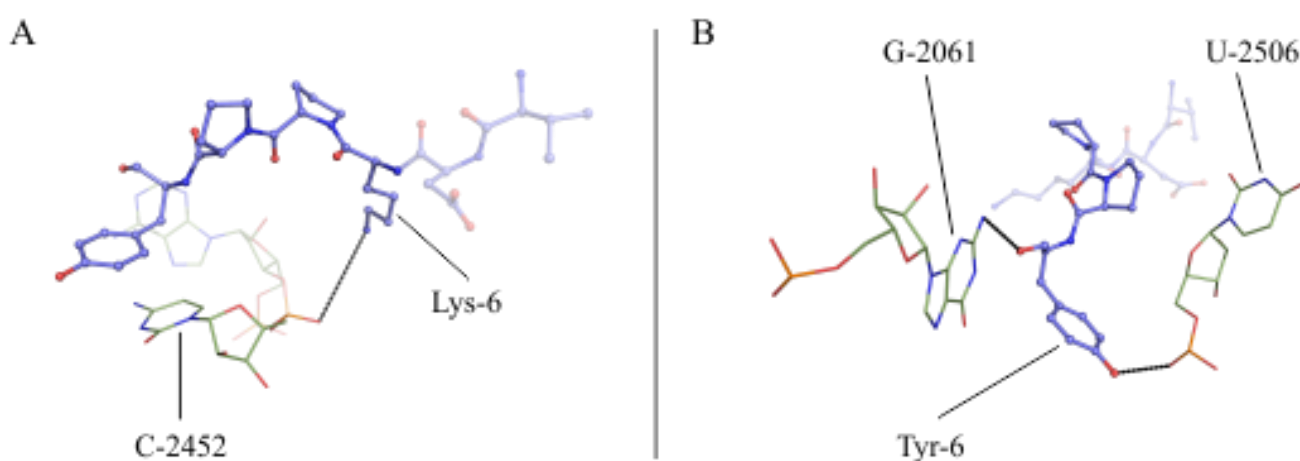


Рисунок 4.4 – Наиболее устойчивые водородные связи антибактериального пептида онкоцина и рибосомного туннеля

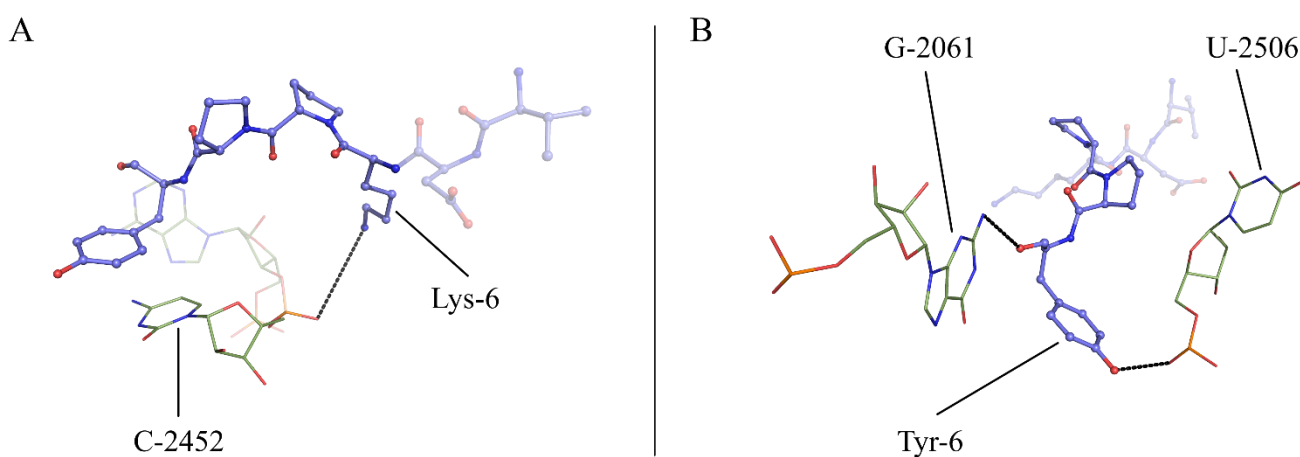


Рисунок 4.5 – Наиболее устойчивые водородные связи онкоциновой части неацилированного конъюгата и рибосомального туннеля

4.3 Сравнение

Целью нашей работы было объяснить полученные (и неопубликованные) аспиранткой МГУ 3.3. Хайруллиной данные о связывании десмикозин-онкоциновых конъюгатов. Установлено, что с увеличением количества аминокислотных остатков в этерефицирующем десмикозин N-концевом домене онкоцина увеличивается и константа диссоциации, то есть, уменьшается сродство конъюгата к рибосомному туннелю. Как выполненное нами моделирование объясняет наблюдаемые явления?

Таблица 4.3. – константы диссоциации соединений (по данным неопубликованной статьи аспирантки 3.3. Хайруллиной)

Соединение	$K_D, \text{нМ}$
Tyl	0.4 ± 0.1
Des	2.7 ± 0.6
DesAc ₃	4.1 ± 0.7
DesAc ₃ CAVAVoc	70 ± 10
DesAc ₃ GABA4per	80 ± 20
DesAc ₃ GABA5per	160 ± 30
DesAc ₃ GABA6per	320 ± 60

Остающиеся после синтеза на остатках мицинозы и микаминозы защитные ацетильные группы препятствуют образованию критически важных для связывания десмикозиновой части конъюгата водородных связей, поскольку они и замещают участвующие в них протоны, и создают стерические противоречия. Ацетильные группы не дают водородным связям образовываться должным образом, как в десмикозине и онкоцин-десмикозиновом конъюгате. Водородные связи мицинозы и микаминозы не только удерживают конъюгат в рибосомном туннеле сами по себе, но и устанавливают центральный элемент десмикозина — тилонолид — оптимальным для образования ковалентной связи с остатком A2062 образом.

Можно заметить, что в десмикозин-онкоциновом конъюгате остаток десмикозина образует менее стабильные взаимодействия с рибосомным туннелем, чем сам десмикозин, а водородные связи шестичленного N-концевого домена онкоцина отличаются от водородных связей самого онкоцина. Причина этого, по всей видимости, в том, что оба этих элемента, соединённые через остаток γ -аминомасляной кислоты, должны были взаимно усиливать связывание друг друга с рибосомным туннелем — но вместо этого взаимно ослабляют друг друга, причём десмикозиновый элемент сохраняет свои взаимодействия, а онкоциновый — нет. Причина, по всей видимости, в том, что γ -аминомасляная кислота оказывается слишком коротким соединителем, неспособным релаксировать колебания обоих элементов в их сайтах связывания, что было бы возможно, если бы в качестве соединителя использовались аминокислоты с более длинной алифатической цепью, например, δ -аминовалериановая или ϵ -аминокапроновая кислоты.

Если же водородные связи, удерживающие десмикозиновую часть, будут уничтожены ацилированием соответствующих гидроксильных групп мицинозы и микаминозы, то даже это противоречивое согласованное связывание будет радикально ослаблено: N-концевой домен онкоцина не сможет удержать десмикозиновый элемент в нужном месте, и поэтому он не сможет образовать ковалентную связь с экзоциклической группой аденина A2062. В результатах проведенного моделирования ацилированного конъюгата мы видим, как характерные водородные связи десмикозинового элемента пропадают, а некоторые водородные связи онкоцинового элемента частично восстанавливаются в некоторых моделях.

5 ВЫВОДЫ

В ходе данной работы нами были изучены взаимодействия между антибиотиком десмикозином, пептидом онкоцина, и десмикозин-онкоциновым конъюгатом и рибосомным туннелем *E. coli*.

Сопоставление стабильности водородных связей и стэкинг-взаимодействий показало, что в неацилированном десмикозин-онкоциновом конъюгате взаимодействия десмикозиновой части сохраняются, но ослабевают сравнительно с взаимодействиями десмикозина, тогда как взаимодействия онкоциновой части полностью изменяются относительно онкоцина. Причиной тому является взаимная конкуренция обеих частей конъюгата за связывание с рибосомным туннелем, обусловленная недостаточной длиной и конформационной подвижностью соединителя.

Анализ водородных связей и стэкинг-взаимодействий, а также визуализаций молекулярно-динамических траекторий подтвердил исходное предположение о том, что ацилирование гидроксильных групп остатков мицинозы и микаминозы делает невозможным образование водородных связей, критичных для удержания десмикозиновой части ацилированного конъюгата в сайте связывания макролидов, так что ацилированный конъюгат удерживается в нём только благодаря онкоциновой части.

ABSTRACT

Bragina O.S. The study of the interaction of oncocin - desmicosin conjugates with the ribosomal method of molecular dynamics modeling - Chelyabinsk: SUSU, ET-431, 2020. - 40 p., 7 fig., 6 tables, Bibliogr. 31 references

Desmicosin, oncocin, oncocin-desmicosin conjugates, ribosome, anti-biotics, molecular dynamics.

The object of the study is oncocin-desmicycin conjugates.

Objective - to study the binding of the oncocin-desmicosin conjugate and the acylated oncocin-desmicosin conjugate with the bacterial ribosome by molecular dynamics modeling

To achieve the goal of the study, the following tasks were solved:

- A literature review on the research problem was conducted;
- docking of oncocin and acylated desmycosin was performed;
- the optimal positions of the acylated oncocin-desmicosin conjugates were selected, which most likely reflect the positioning of the conjugate inside the ribosomal tunnel;
- binding of conjugates to the E. coli ribosome was studied by molecular dynamics modeling;
- a comparison of the binding of free oncocin and desmycosin, as well as their conjugates. According to the molecular dynamics data, one can judge the stability of the formed oncocin-desmycosin complexes.

Scope - the data obtained can be used to further develop new antibiotics that can inhibit protein biosynthesis.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- 1 Mankin, A.S. Ribosomal Antibiotics / A.S. Mankin // *Molecular Biology*. – 2001. – V. 35 N 4. – P. 509–520.
- 2 Palade, G.E. A small particulate component of the cytoplasm / G.E. Palade // *The journal of biophysical and biochemical cytology*. – 1955. – V. 1 – P. 59–68.
- 3 Roberts, R.B. Introduction in *Microsomal Particles and Protein Synthesis* / R.B. Roberts // Program Press: NY. – 1958.
- 4 Nierhaus, K.H. Protein Synthesis and Ribosome Structure / K.H. Nierhaus, D.N. Wilson // Wiley VCH : Berlin. – 2004.
- 5 Orelle, C. Protein synthesis by ribosomes with tethered subunits / C. Orelle, E.D. Carloson, A.S. Mankin // *Nature*. – 2015. – V. 524. – P. 119–124.
- 6 Грайфер, Д.М. Биосинтез белка: учебное пособие / Д.М. Грайфер. – Новосибирск: Новосибирский государственный университет. – 2011. – 104 с.
- 7 Биосинтез белка. – <https://scienceland.info/biology10/translation-phases>.
- 8 Спиринов, А.С. Молекулярная биология: Структура рибосомы и биосинтез белка: учебник для студентов биол. спец. вузов / А.С. Спиринов. – М: Академия. – 2011 – 303 с.
- 9 Weixlbaumer, A. Insights into translational termination from the structure of RF2 bound to the ribosome / A. Weixlbaumer, H. Jin, C. Neubauer et al. // *Science*. – 2008. – V. 322. – P. 953–956.
- 10 Zavialov, A. A posttermination ribosomal complex is the guanine nucleotide exchange factor for peptide release factor RF3 / A.Zavialov, R. Buckingham, M. Ehrenberg // *Cell*. – 2001. – V. 107. – P. 115–124.
- 11 Reusch, R.N. Putative structure and functions of a poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes / R.N. Reusch, H.L.Sadof // *Proc. Natl. Acad. Sci.: USA*. – 1988. – V. 85. – P. 4176–4180.
- 12 Рош, Р. Н. Транспорт ионов через мембрану посредством полифосфата / поли-(Б1)-3-гидроксибутиратных комплексов / Р.Н. Рош // *Биохимия*. – 2000. – Вып. 65, №3. – 335–352 с.
- 13 Rospert, S. Ribosome function: Governing the fate of a nascent polypeptide / S. Rospert // *Curr. Biol*. – 2004. – P. 386–388.
- 14 Nissen, P. The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis / P. Nissen, J. Hansen, N. Van et al. // *Science*. – 2000. – V. 289 – P. 920–930.
- 15 Богданов, А.А. Рибосомный туннель и регуляция трансляции / А.А. Богданов, Н.В. Сумбатьян, А.В. Шишкина и др. // *Успехи биологической химии*. – 2010. – Т. 50 – 5–42 с.
- 16 Синопольников, А.И. Безопасность макролидных антибиотиков: критический анализ / А.И. Синопольников, И.В. Андреева, О.У. Стецнюк // *Клиническая медицина*. – 2012. – Вып. 3. – 23–30 с.

- 17 Kannan, K. Selective Protein Synthesis by Ribosomes with a Drug-Obstructed Exit Tunnel / K.Kannan, N. Vázquez-Laslop, A.S. Mannkin // *Cell* –2012. –V.153, N 3 – P.508–520.
- 18 Klein, J.O. History of macrolide use in Pediatrics / J.O. Klein // *The pediatric Infections*. – 1997. – V. 16. – P. 427 – 431.
- 19 Chiriac, Anca.M. Pediatric Allergy: Principles and Practice / Anca.M. Chiriac // *ELSEVIER: Toronto* – 2016 – P. 498 – 505.
- 20 Mazzei, T. Chemistry and mode of action of macrolides / T. Mazzei, E. Mini, A. Novelli // *J Antimicrob Chemother*. – 1993. – P. 1–9.
- 21 Vanuffel, P. Mechanism of action of Streptogramins and Macrolides/ P. Vanuffel, C. Cocito // *Drugs*. – 1993. – V. 51 – P. 21–30.
- 22 Simalack, J.D. Tetracyclines, Chloramphenicol, Erythromycin, Clindamycin, and Metronidazole / J.D. Simalack, W.R. Wilson // *Mayo Clin. Proc*. – 1991. – V. 60. – P. 1270 –1280.
- 23 Антибиотики и антимикробная терапия. – <http://www.antibiotic.ru/antibiotics.php>.
- 24 Polikanov, Y.S The Mechanisms of Action of Ribosome, Targeting Peptide Antibiotics / Y.S. Polikanov, N.A. Aleksashin, B. Beckert et al. // *Front Mol Biosci*. – 2018. – V. 5. – P. 48.
- 25 Макаров, Г.И. Взаимодействие фенилаланинового С20 производного тилозина с рибосомным туннелем / Г.И. Макаров, А.А. Богданов, И.В.Сумбатьян // *Биохим*. – 2017. –Вып.82, № 8 – 1199–1208 с.
- 26 Roy, R.N.The mechanism of inhibition of protein synthesis by the proline-rich peptide oncocin/ R.N.Roy, I.B. Lomakin , M.G. Gagnon et al. // *Nat Struct Mol Biol*. – 2015. – V.22, N 6. – P. 466.
- 27 Seefeldt, A.C. Structure of the mammalian antimicrobial peptide Bac7(1-16) bound within the exit tunnel of a bacterial ribosome / A.C. Seefeldt, M. Graf, N. Perebaskine,F. et al. // *Nucleic Acids Res*. – 2016. – V. 44, N 5. – P. 2429–2438.
- 28 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.
- 29 Dunkle, J.A. Structures of the Escherichia coli ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action / J.A. Dunkle, L. Xiong, // *Proc. Nat. Acad. of Sci.USA*. – 2010. – V. 1. – P. 17152–17157.
- 30 Cannone, J.J. The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other / J.J. Cannone // *RNAs*. – 2002. – V. 3. – P. 1–31.
- 31 Ruiz Carmona, rDock: a fast, versatile and open source program for docking ligands to proteins and nucleic acids / Carmona Ruiz, D. Alvarez Garcia, N. Foloppe, // *PLoS Comput. Biol*. – 2010. – V. 10.