

ВЛИЯНИЕ КОНФОРМАЦИИ СПИРАЛИ Н38 НА СТАБИЛЬНОСТЬ ПРЕДРЕАКЦИОННОГО СОСТОЯНИЯ ПЕПТИДИЛТРАНСФЕРАЗНОГО ЦЕНТРА РИБОСОМЫ: МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Т.М. Макарова[✉]

Южно-Уральский государственный университет, Челябинск, Россия

[✉] makarovatm@susu.ru

Аннотация. Молекулярно-динамическое моделирование комплекса 70S рибосомы *E. coli* в каноническом А/А, Р/Р-состоянии, содержащее стоп-пептид ErmBL, позволило наблюдать формирование и дестабилизацию предреакционного состояния пептидилтрансферазного центра (ПТЦ). При отсутствии антибиотиков в рибосоме, субстраты пептидилтрансферазной реакции (ПТР), а именно аминокетиды Lys-aa-тРНК и сложный эфир Asp-Р-тРНК, оказываются стабильно сближены на протяжении 200 нс траектории так, что атомы азота и углерода, между которыми предполагается образование новой пептидной связи, удерживаются на расстоянии не более 4,5 Å. В присутствии же эритромицина в рибосомном туннеле это расстояние за то же время моделирования может увеличиваться до 6 и более Å, при этом искажается сайт связывания ССА-конца А-тРНК. Важную роль в позиционировании А-тРНК играет спираль Н38 23S рРНК: паттерны ее связывания с А-тРНК и соседней спиралью Н84, участвующей в позиционировании уже Р-тРНК, заметно отличаются. В траектории, где субстраты ПТР наиболее сближены, спирали Н38 и Н84 сцеплены стэкинг-взаимодействием между остатками U890 и G2308, а остаток A896 образует стэкинг-контакт с G19 А-тРНК. Присутствие эритромицина в рибосомном туннеле разрушает стэкинг-контакт между Н38 и Н84, а положение А-тРНК изменяется настолько, что она взаимодействует с остатком A896 Н38 другим основанием, С56. Такое искажение связывания А-тРНК приводит к разрушению предреакционной структуры ПТЦ, что объясняет действие антибиотика. Важно понимать, что положение Н38 стоит дополнительно оптимизировать для получения предреакционных структур рибосом из-за недостатка структурных данных относительно этой спирали.

Ключевые слова: рибосома, эритромицин, пептидилтрансферазный центр, молекулярная динамика

Благодарности. Исследование было выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22–24–20030). Авторы благодарят Вычислительный центр МГУ имени М.В. Ломоносова за предоставленную возможность вести расчеты МД на суперкомпьютере «Ломоносов-II».

Для цитирования: Макарова Т.М. Влияние конформации спирали Н38 на стабильность предреакционного состояния пептидилтрансферазного центра рибосомы: молекулярно-динамическое исследование // Вестник ЮУрГУ. Серия «Химия». 2024. Т. 16, № 2. С. 148–158. DOI: 10.14529/chem240217

Original article
DOI: 10.14529/chem240217

EFFECT OF THE H38 HELIX CONFORMATION ON STABILITY OF PRE-REACTIONAL STATE OF PEPTIDYL TRANSFERASE CENTER OF A RIBOSOME: A MOLECULAR DYNAMICS STUDY

T.M. Makarova✉

South Ural State University, Chelyabinsk, Russia

✉ makarovatm@susu.ru

Abstract. Molecular dynamics simulations of the 70 E.coli ribosome complex in the canonical A/A, P/P-state, carrying ErmBL stalling peptide, enabled us to observe formation and destabilization of pre-reactional conformation of the peptidyl transferase center (PTC). In the absence of antibiotics in the nascent peptide exit tunnel (NPET), the peptidyl transferase reaction (PTR) substrates, specifically, the Lys-aa-tRNA aminogroup and the Asp-P-tRNA ester, were found to be steadily close to each other at a distance of no more than 4.5 Å during 200 ns of simulation. In the presence of erythromycin in NPET that distance increased to 6 Å and more during the same time of simulation; moreover, the binding site of the CCA-end of A-tRNA became distorted. An important role in the A-tRNA positioning was played by H38 of 23S rRNA: its binding patterns with A-tRNA and the H84 neighboring helix, which participates in the P-tRNA positioning, altered significantly. In the trajectory, where the PTR substrates are the most converged, the H38 and H84 helices are linked to each other by stacking interaction of the U890 and G2308 residues, and the A896 residue formed a stacking contact with G19 of A-tRNA. The presence of erythromycin in NPET destructs the stacking contact between H38 and H84, while the A-tRNA position alters to such an extent, that it interacts with H38 by its another residue, C56. Such a distortion of the A-tRNA binding results in destruction of the pre-reactional state of PTR, which could explain the antibiotic's action. It is significant that the H38 position is worth to be additionally optimized for obtaining the pre-reactional ribosomal structures due to insufficiency of the structural data regarding this helix.

Keywords: ribosome, erythromycin, peptidyl transferase center, molecular dynamics

Acknowledgments. This research was supported by the Russian Science Foundation (project No. 22–24–20030). The authors are grateful to the Lomonosov Moscow State University Supercomputer Center for the opportunity to carry out MD simulations using the “Lomonosov-II” supercomputer.

For citation: Makarova T.M. Effect of the H38 helix conformation on stability of pre-reactional state of peptidyl transferase center of A ribosome: a molecular dynamics study. *Bulletin of the South Ural State University. Ser. Chem.* 2024;16(2):148–158. (In Russ.) DOI: 10.14529/chem240217

Введение

Одним из средств, используемых бактериями для защиты рибосомы от антибиотиков, является адаптивное метилирование остатков рибосомных РНК, участвующих в связывании антибиотиков и реализации их воздействия на рибосому. Примером может служить метилтрансфераза Erm [1], чей биосинтез регулируется лидерным пептидом ErmBL. Этот фермент вводит две метильные группы на экзоциклическую аминогруппу основания A2058 23S рибосомной РНК, что подавляет связывание макролидов в рибосомном туннеле. Матричная РНК, кодирующая стоп-пептид ErmBL и метилтрансферазу Erm, образует две шпильки: первая включает конец кода ErmBL, вторая – скрывает открытую рамку считывания Erm. Синтез лидерного пептида ErmCL приводит к расплетанию первой шпильки и перестройке вторичной структуры матричной РНК: вторая шпилька также расплетается, а её 5'-концевой участок формирует новую шпильку с 3'-концевым участком первой. При этом освобождается открытая рамка считывания Erm и становится возможен его синтез. В отсутствие антибиотика синтез ErmBL быстро завершается, так что открытая рамка считывания Erm скоро скрывается обратно. В присутствии антибиотика синтез ErmBL останавливается, так что открытая рамка считывания Erm надолго становится доступна другим рибосомам, которые начинают вырабатывать метилтрансферазу, обеспечивающую устойчивость рибосом к антибиотикам.

В присутствии эритромицина биосинтез лидерного пептида ErmBL производит аминокислотную последовательность M₁LVFQMRNVDK₁₁, где последний остаток Lys11 так и остается

связанным с аминоксил-тРНК, так как именно на нем не происходит реакции транспептидации. Критически важными для останова пептидилтрансферазной реакции (ПТР) в пептиде являются остатки Arg7 и Val9-Lys11, то есть находящиеся в самой верхней части рибосомного туннеля. При этом стэкинг-контакт между Phe4 и основанием U2609 не важен для останова, но важен контакт Arg7-U2586 [2].

Известна структура комплекса рибосомы *E. coli*, связавшей эритромицин и пептид ErmBL, полученная методом криоэлектронной микроскопии (PDB ID 5JTE), и даже есть работы с расчетом молекулярной динамики, основывающиеся на этой структуре [3], хотя и использующие довольно простую модель воды SPC/E и несколько устаревшее ныне силовое поле parm99. Но до сих пор никто не пытался анализировать удаленные изменения от воздействия связавшихся в рибосомном туннеле антибиотиков и растущих пептидов. Более того, в упомянутой работе эффект антибиотика был сведен к ограничению подвижности пептида, смещению A76 пептидил-тРНК на 1–2 Å и невозможности для остатков U2506 и U2585 занять активированное положение, тогда как сам комплекс тРНК с рибосомой не анализировался. Мы же полагаем, что изменения в пептидилтрансферазном центре (ПТЦ) и в структуре связывания аминоксил-тРНК могут быть более существенными и включать дестабилизацию последней, поскольку из тех же экспериментальных данных известно, что пептид ErmBL стабилизирует преаккомодационное состояние аминоксил-тРНК, в котором ССА-конец не вошел в контакт с А-сайтом [2]. Цель данного исследования состояла в том, чтобы найти аллостерические изменения в рибосоме от воздействия эритромицина с ErmBL в туннеле и построить структурные модели с «выключенным» состоянием ПТЦ, включающие модель удаленных участков, что могло бы приблизить нас к поиску аллостерических эффекторов на ПТЦ.

В этом исследовании мы смоделировали несколько траекторий комплекса рибосомы с Lys-А-тРНК и ErmBL-Р-тРНК в присутствии и отсутствие эритромицина. Мы смоделировали по 3 траектории длиной 200 нс для каждого из видов систем с тем, чтобы проанализировать первичные изменения структуры при запуске МД. И этот анализ дал интересные результаты.

Экспериментальная часть

Моделируемая система. Исходная система была построена на основе структуры рибосомы *E. coli*, несущей эритромицин А и лидерный пептид ErmBL (PDB ID: 5JTE), в которую были добавлены модифицированные гетероциклические основания в соответствии с банком данных [4]. Подготовка системы состояла из процедур, описанных ниже:

- Установка недостающих белка L1 и нуклеотидов 884–893 23S рРНК из другой структуры рибосомы *E. coli* (PDB ID: 4V7D [5]); рибосомных белков L10 и L31 из структуры рибосомы *E. coli* (PDB ID: 5AFI [6]); 1–10 остатков рибосомного белка bL27 из структуры *T. thermophilus* (PDB id: 1VY4 [7]) (с мутагенезом G6A и L7G по нумерации *E. coli*); остатки 16–17 Lys-тРНК^{Lys} в А-сайте из структуры Lys-тРНК и некоторых недостающих атомов в белковых остатках путем выравнивания полных аминокислотных структур.

- Оптимизация структуры вновь введенных фрагментов методом наискорейшего спуска в вакууме при фиксации координат атомов остальной части рибосомы.

- Добавление ионов калия K^+ с улучшенными параметрами для воды TIP4P_{EW} [8] вблизи отрицательно заряженных групп [9] для нейтрализации заряда системы и дальнейшая оптимизация ионов K^+ в вакууме при фиксации рибосомы и ее лигандов.

- Установка рибосомы в ромбическую ячейку размером $27 \times 28 \times 25$ нм, заполненную молекулами воды TIP4P_{EW}, обеспечивающими слой чистого растворителя толщиной не менее 2 нм с каждой стороны, и добавление ионов K^+ , Mg^{2+} и Cl^- в количестве, соответствующем концентрации KCl в 100 мМ и $MgCl_2$ в 6 мМ (без учета противоионов K^+ и Mg^{2+} из исходной структуры).

- Оптимизация структуры растворителя и ионов с последующим расчетом молекулярной динамики протяженностью 5 нс, в ходе которой на все атомы рибосомы, кроме атомов водорода, были наложены позиционные ограничения с константой жесткости 1000 кДж/моль·нм.

- Оптимизация системы короткой молекулярной динамикой с позиционными ограничениями для C α -атомов для аминокислотных остатков или атомов фосфора рибонуклеотидных остатков вплоть до стабилизации RMSD (обычно 5–10 нс).

Условия моделирования

Молекулярно-динамическое моделирование выполнялось посредством пакета GROMACS 5.1.4 [10, 11] и силового поля AMBER-ff14SB [12]. Пространственные структуры и молекулярные электростатические потенциалы неканонических остатков и эритромицина были получены с помощью квантово-химических расчетов методом Хартри – Фока с базисным набором 6-31G*. Точечные заряды были рассчитаны с использованием модели RESP [13]. Моделирование проводилось при $T = 310$ К, поддерживаемой термостатом масштабирования скоростей с дополнительным стохастическим членом [14] и периодом релаксации 0,1 пс, и изотропным постоянным давлением, контролируемым баростатом Берендсена [15] с периодом релаксации 5 пс. По всем трём измерениям действовали периодические граничные условия. Радиус обрезания для ван-дер-ваальсовых и кулоновских взаимодействий составлял 1 нм. Электростатические взаимодействия обрабатывались с помощью сети частиц Эвальда [16] с шагом сетки 0,125 нм и интерполяцией четвертого порядка. Шаг интегрирования во всех расчетах составлял 2 фс. Алгоритм LINCS [17] применялся для ограничения длины ковалентных связей атомов водорода. Остальные условия МД-моделирования были идентичны описанным в работе [20].

Методы анализа траекторий. Встречаемость водородных связей и стэкинг-взаимодействий оценивали на конечных участках траекторий с установившейся величиной RMSD в соответствии с определенными геометрическими критериями. Для водородных связей это:

- расстояние между донором и акцептором водорода не более 3,5 Å,
- угол акцептор – донор – водород не более 30°.

Что касается стэкинг-взаимодействия, то среднее арифметическое координат трёх определенных атомов в ароматической плоскости (C², C⁴ и C⁶ для пиримидиновых оснований и N¹, N³ и C⁸ для пуриновых, аналогично для ароматических аминокислот) принималось за центр азотистого основания, а плоскость, содержащая эти три точки, считалась «плоскостью основания», поэтому требования для распознавания стэкинг-взаимодействия в определенном кадре траектории были следующими:

- расстояние между центрами не более 5,5 Å,
- угол между плоскостями не более 30°,

• угол между плоскостью первого основания и отрезком между центрами более 45°; в противном случае копланарные основания, противостоящие друг другу как пара оснований, могут быть ошибочно определены как стэкинг.

Средние встречаемости взаимодействий и стандартные отклонения рассчитывали по трём соответствующим значениям для траекторий систем, содержащих эритромицин. Консервативность остатков РНК оценивали по базе данных SILVA [1].

Обсуждение результатов

Анализ молекулярно-динамических траекторий показал значительную подвижность пептида в туннеле и варибельность его контактов даже в присутствии антибиотика. Особенно ярко эта варибельность проявляется для первых 6 остатков аминокислот, для которых не обнаруживалось почти никаких воспроизводящихся связей в присутствии ли эритромицина или в его отсутствии. Так, в большинстве траекторий разрушается стэкинг-взаимодействие Phe4 ErmBL с U2609 23S рРНК, что согласуется с биохимическими данными о том, что мутации по этим остаткам не влияют на эффективность останова трансляции. Остаток Arg7 заякоривается своей боковой группой за фосфаты остатков 23S рРНК в верхней части туннеля, в первую очередь это фосфатные группы U2441, C2063, A2439. Также он образует водородные связи с одним из экзоциклических кислородов остатка U2586 23S рРНК, которые есть лишь в одной из трех траекторий без эритромицина. Взаимодействие этих остатков важно для останова ПТР. Остаток Asn7 своей остоной аминокислотной группой образует водородные связи с A2062 (в присутствии эритромицина – чаще). Боковая группа не образует стабильных и воспроизводящихся связей, что коррелирует с данными о том, что этот остаток можно заменить на аланин без снижения эффекта останова ПТР. Амидная группа Val9 формирует остоную связь с остоным кислородом Arg7 только в присутствии эритромицина. Вероятно, эта связь вносит свой вклад в стабилизацию конформации верхней части пептида.

Сам эритромицин в ходе моделирования траектории молекулярной динамики под действием пептида несколько смещается, образуя контакты с G2502 и C2610 преимущественно кладинозой. При этом сохраняется довольно слабая водородная связь между экзоциклической аминогруппой A2058 и дезоамином вследствие его небольшого смещения под действием пептида относительно положения в структуре. Основные взаимодействия пептида и эритромицина в туннеле представлены в табл. 1. Но главный эффект от связывания пептида в туннеле проявлялся на удаленных от него функциональных сайтах.

В отсутствие эритромицина стабилизация структуры ПТЦ и тРНК в рибосоме происходила достаточно быстро, в течение первых 40–60 нс, хотя пептид был более подвижен, иногда занимая то пространство, где ранее находился эритромицин, что можно отследить по графикам RMSD как целой рибосомы, так и области туннеля и связывания тРНК. В этих траекториях атомы потенциальной новой пептидной связи, а именно азот аминогруппы лизина на Lys-A-тРНК и карбоксильный атом углерода аспарагиновой кислоты на ErmBL-тРНК, именуемые в дальнейшем атакующим и атакуемым атомами соответственно, оставались сближенными на 3–4,5 Å (рис. 1, А). При этом первую траекторию можно считать «лучшей» по этому показателю: в ней означенное расстояние в среднем составляло $3,4 \pm 0,2$ Å. Аминогруппа при этом находилась примерно перпендикулярно плоскости сложноэфирной группы, что удобно для нуклеофильной атаки (рис. 2, А). Это положение обеспечивалось связями Р- и А-тРНК в районе ПТЦ, в том числе образованием стопки последовательных стэкинг-контактов ССА-конца А-тРНК с А-спиралью (H92): основаниями U2555, C2556, G2557 и далее.

Таблица 1

Встречаемость нековалентных взаимодействий пептида ErmBL и эритромицина с рибосомой в различных состояниях

Донор	Акцептор	по Ery	Ery I	Ery Ia	Ery Ib	Ery III
Водородные связи						
A2058/N ⁶ -H	Ery/DES/O ₂ '	0 ± 0	7	18	15	25
A2059/N ⁶ -H	Ery/DES/O ₂ '	0 ± 0	0	2	14	0
Ery/CLD/O ₄ -H	U2506/O ⁴	0 ± 0	16	74	92	0
A2062/N ⁶ -H	ErmBL/Phe4/O	25 ± 43	0	38	0	94
A2062/O ₂ -H	ErmBL/Asn8/O	23 ± 40	21	79	1	25
A77/O ₂ -H	ErmBL/Asp10/O _γ	7 ± 13	25	1	19	0
A77/O ₂ -H	ErmBL/Asp10/O _{γ'}	24 ± 42	50	2	16	86
ErmBL/Arg7/N _δ -H	C2442/O _{phosph1}	0 ± 0	0	7	31	0
ErmBL/Arg7/N _ω -H	A2062/O ₃ '	13 ± 22	26	59	0	0
ErmBL/Arg7/N _ω -H	A2062/O ₄ '	0 ± 0	15	1	13	0
ErmBL/Arg7/N _ω -H	A2439/O _{phosph2}	37 ± 34	0	0	0	39
ErmBL/Arg7/N _ω -H	C2063/O _{phosph1}	44 ± 42	0	8	86	74
ErmBL/Arg7/N _ω -H	C2442/O _{phosph2}	0 ± 0	11	21	68	0
ErmBL/Arg7/N _ω -H	A2439/O _{phosph2}	34 ± 56	0	0	0	28
ErmBL/Arg7/N _ω -H	U2441/O _{phosph2}	83 ± 17	64	99	95	97
ErmBL/Arg7/N _ω -H	U2586/O ₂ '	2 ± 3	14	0	0	0
ErmBL/Arg7/N-H	U2586/O ²	28 ± 49	33	0	0	69
ErmBL/Arg7/N-H	U2586/O ⁴	0 ± 0	0	31	86	0
ErmBL/Asn8/N-H	A2062/N ³	13 ± 18	89	20	64	0
ErmBL/Asn8/N-H	A2062/O ² '	20 ± 35	2	21	26	58
ErmBL/Lys11/N-H	ErmBL/Asp10/O _γ	20 ± 35	24	60	0	30
ErmBL/Lys11/N-H	ErmBL/Asp10/O _{γ'}	6 ± 10	62	10	0	9
ErmBL/Lys11/N _ε -H	C2452/N ³	16 ± 27	1	29	1	4
ErmBL/Val9/N-H	ErmBL/Arg7/O	0 ± 0	27	4	47	0
G2061/N ² -H	ErmBL/Asp10/O _γ	31 ± 8	57	0	0	5
G2061/N ² -H	ErmBL/Asp10/O _{γ'}	36 ± 28	13	58	9	0
U1781/N ³ -H	ErmBL/Leu2/O	0 ± 0	51	0	0	0
U2585/N ³ -H	ErmBL/Lys11/O	42 ± 41	0	0	0	0
U2586/N ³ -H	ErmBL/Gln5/O	0 ± 0	88	80	98	0
A77/O ₂ -H	ErmBL/Asp10/O	0 ± 0	0	0	46	0

Окончание табл. 1

Донор	Акцептор	no Ery	Ery I	Ery Ia	Ery Ib	Ery III
ErmBL/Lys11/N-H	C2507/O _{phosph1}	0 ± 0	0	3	82	0
A2058/N ⁶ -H	Ery/DES/O ₂	0 ± 0	7	18	15	25
A2059/N ⁶ -H	Ery/DES/O ₂	0 ± 0	0	2	14	0
Ery/CLD/O ₄ -H	U2506/O ⁴	0 ± 0	16	74	92	0
G2505/N ¹ -H	Ery/CLD/O ₃	0 ± 0	0	0	0	84
L22/Lys90/N _ε -H	Ery/LCE/O ₁₂	0 ± 0	0	0	0	86
A2062/N ⁶ -H	ErmBL/Phe4/O	25 ± 43	0	38	0	94
A2062/O ₂ -H	ErmBL/Asn8/O	23 ± 40	21	79	1	25

Примечание. No Ery – статистика по трем стабильным участкам траекторий без эритромицина (среднее ± стандартное отклонение), Ery I – состояние первой траектории с эритромицином после 80 нс, Ery Ia – состояние второй траектории с эритромицином между 40 нс и 140 нс, Ery Ib – состояние второй траектории с эритромицином после 160 нс, Ery III – состояние третьей траектории с эритромицином после 220 нс.

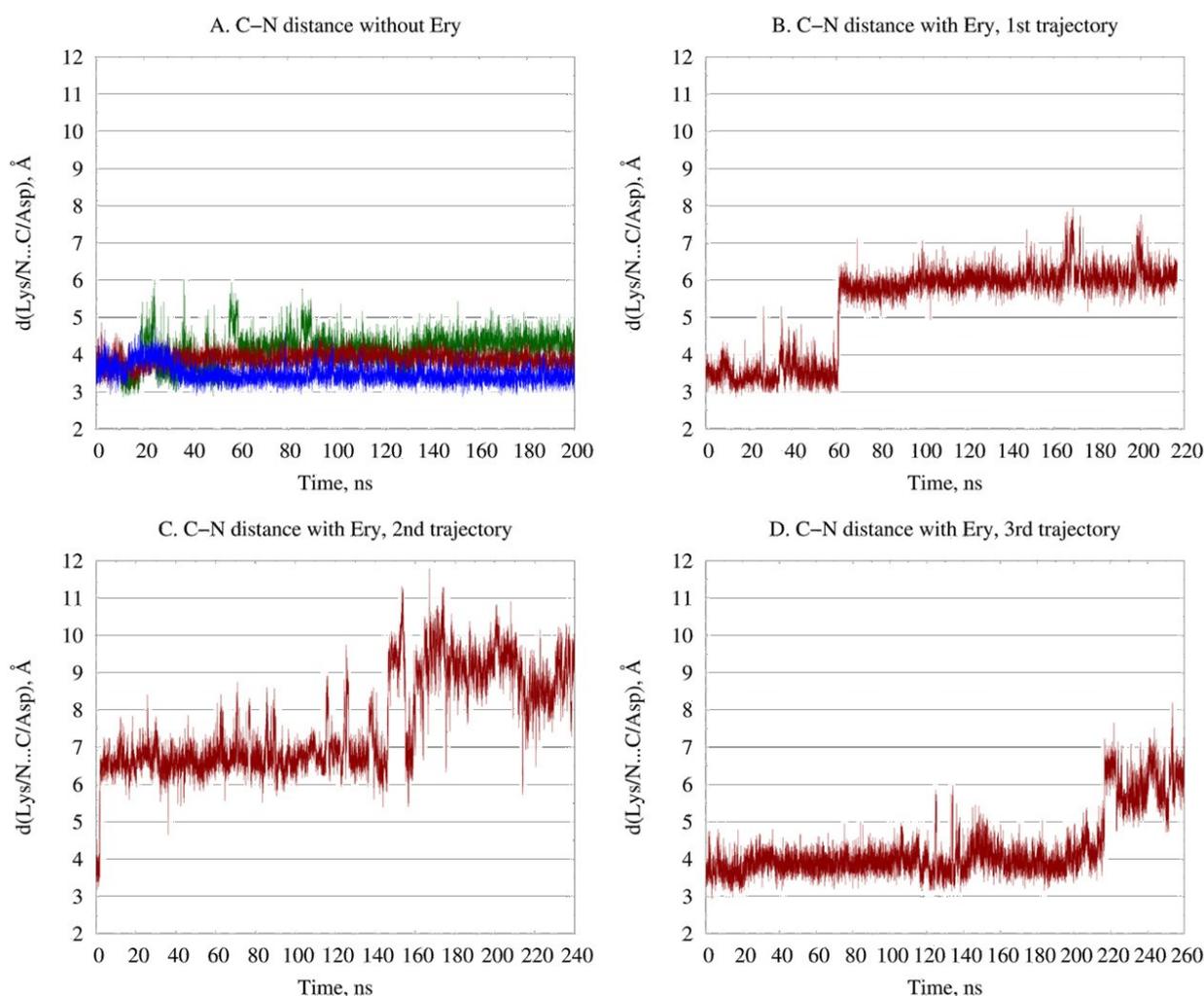


Рис. 1. Графики расстояний между атомами потенциальной пептидной связи между Asp10 и Lys11 в стоп-пептиде ErmBL, образование которой не происходит при наличии эритромицина в туннеле:
А. Расстояние С–N для траекторий без эритромицина. Синим цветом показана первая, багровым – вторая, зеленым – третья траектории. **В.** Расстояние С–N в первой траектории с эритромицином. **С.** Расстояние С–N во второй траектории с эритромицином. **Д.** Расстояние С–N в третьей траектории с эритромицином

Встречаемость взаимодействий в А-спирали представлена в табл. 2.

Встречаемость нековалентных взаимодействий в рибосомном туннеле и ближайшей окрестности в различных траекториях

Донор	Акцептор	no Ery	Ery I	Ery Ia	Ery Ib	Ery III
Водородные связи						
C2611/N ⁴ -H	G2505/O ⁶	0 ± 0	54	12	44	0
A2450/N ⁶ -H	C2063/N ³	3 ± 3	93	43	24	16
G2446/N ² -H	C2065/O ²	8 ± 8	36	30	81	92
G830/N ¹ -H	m ² G2445/O ₂	41 ± 12	2	0	0	3
L4/Gly64/N-H	A2060/O _{phosph1}	0 ± 0	81	71	75	64
L4/Lys63/N _ε -H	G2061/O _{phosph1}	0 ± 0	46	36	50	0
L4/Lys63/N _ε -H	G2061/O _{phosph2}	0 ± 0	31	29	44	38
L4/Thr65/N-H	A2060/O _{phosph1}	2 ± 2	65	44	35	26
Стэкинг-взаимодействия						
A-tRNA/C74	U2555	98 ± 1	8	85	47	98
U1944	U1955	70 ± 14	0	86	16	0
G2557	C2556	92 ± 1	94	94	96	0
C2559	A2560	54 ± 7	0	10	2	0
A2614	A2577	37 ± 4	12	0	0	0
A945	A2448	43 ± 13	0	0	0	0
C2063	G2061	26 ± 20	100	96	90	100

Примечание. No Ery – статистика по трем стабильным участкам траекторий без эритромицина (среднее ± стандартное отклонение), Ery I – состояние первой траектории с эритромицином после 80 нс, Ery IIa – состояние второй траектории с эритромицином между 40 нс и 140 нс, Ery IIb – состояние второй траектории с эритромицином после 160 нс, Ery III – состояние третьей траектории с эритромицином после 220 нс.

В случае же присутствия эритромицина в туннеле конформационные перестройки, происходившие в нем, приводили к серьезному разобщению атакующей и атакуемой группы. В разных траекториях это происходило за различное, но обозримое время моделирования: в первой траектории это происходило на 60–70 нс, во второй траектории – в первых же наносекундах, в третьей – после 220 нс моделирования, что можно отследить по графикам расстояний между атакующим и атакуемым атомам (см. рис. 1B–D). Во второй траектории разобщение атакующего атома азота и атакуемого атома углерода достигало еще больших величин после 140 нс.

Назовем участок резкого изменения расстояний между атакующим и атакуемым атомами в ПТЦ «переходом», которых наблюдалось всего четыре. Назовем эти переходы и состояния, формирующиеся после них, как I, IIa, IIb и III согласно номерам траекторий, где во второй наблюдалось два перехода. Каждый такой переход сопровождался существенным искажением связывания A-tРНК, в первую очередь, с так называемой A-спиралью (H92). При каждом переходе так или иначе нарушались взаимодействия тРНК с этими спиральями. Так, в переходах I и IIa происходил полный выход ССА-конца тРНК из стэкинг-взаимодействия с A-спиралью, в результате чего последняя замещала ССА-конец тРНК основаниями G2553 и U2554, образуя стэкинг-взаимодействия уже с ними (рис. 2B). В переходах IIb и III стэкинг ССА-конца тРНК с A-спиралью хотя и сохранялся, но структура комплекса серьезно искажалась из-за разрыва стэкинг-контакта оснований C2556 и G2557, то есть надлома самой A-спирали чуть выше взаимодействия с ССА-концом тРНК (рис. 2D). Во всех этих случаях это приводило к разобщению субстратов ПТР, включающему образование новой пептидной связи даже спонтанно.

При этом основной «ловушкой» для атакующей аминокислоты лизина в присутствии эритромицина являлась боковая карбоксильная группа Asp10, с которой атакующая аминокислота образовывала водородную связь, чем стабилизировалось «арестованное» состояние ПТЦ. Впрочем, во второй траектории в состоянии IIb формировалась водородная связь уже между боковыми группами Lys11 и Asp10, что еще больше расталкивало реакционные центры, полностью отворачивая атакующую аминокислоту от ПТЦ. Таким образом, сами субстраты являются «проблемными» для ПТР, поскольку при малейшем нарушении структуры связывания склонны фиксировать себя в неактивной конформации, что и объясняет специфичность останова трансляции на

этих остатках. Хотя этот фактор является лишь вспомогательным, так как при замене Asp10 на некоторые другие остатки без карбоксильной группы останков также происходил, хотя и в меньшей степени [21]. Так что ключевую роль в останове играют именно искажения структуры реакционного комплекса в ПТЦ.

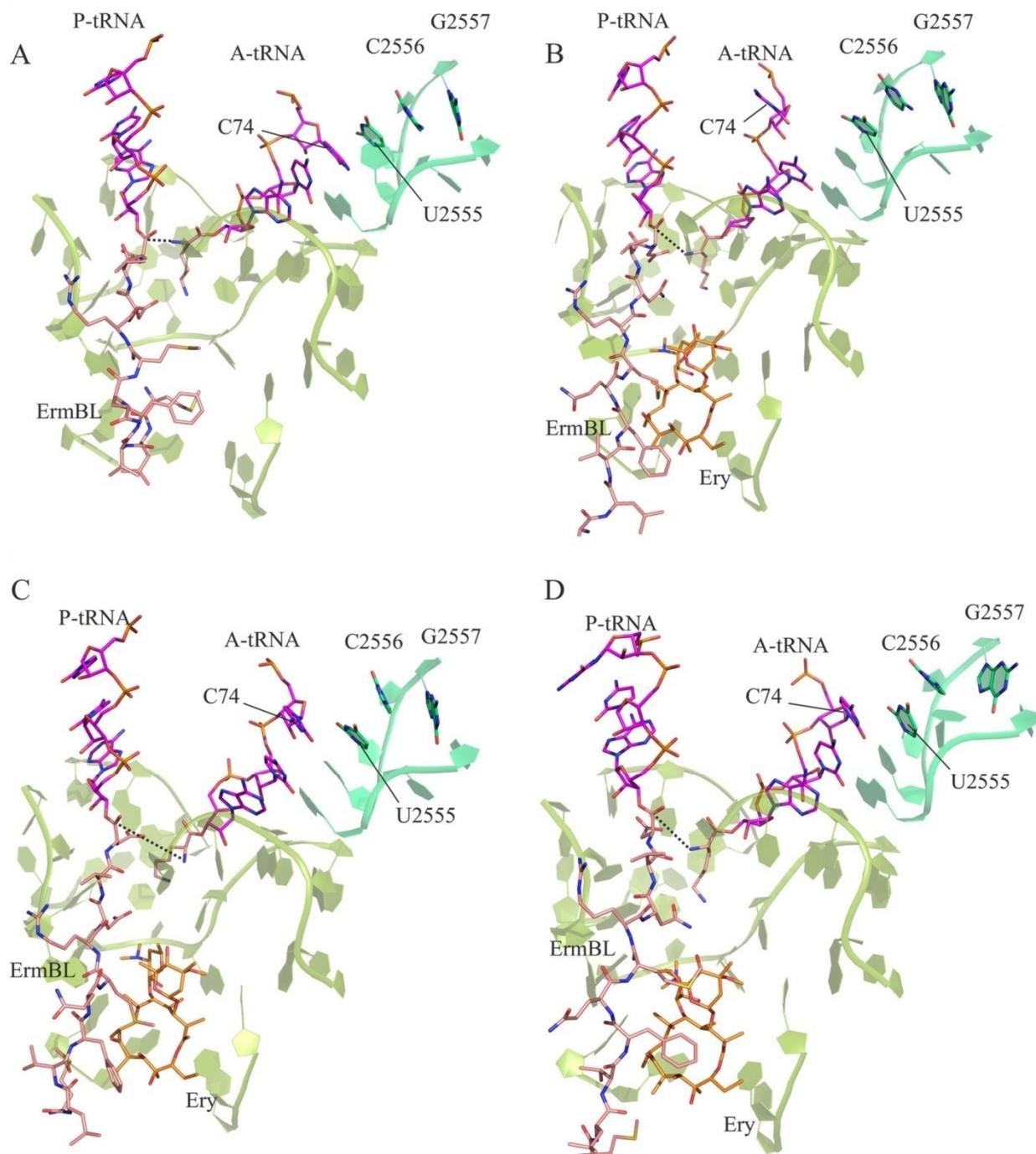


Рис. 2. Структура комплекса рибосомы с Lys-A-тРНК и ErmBL-P-тРНК в отсутствие и присутствии эритромицина в туннеле. Малиновым цветом показаны ССА-концы тРНК, розовым – пептид ErmBL, ярко-салатовым выделена т. н. А-спираль (H92), с вершиной которой ССА-конец А-тРНК образует стопку согласно структурным данным. Черным пунктиром соединены атомы потенциальной новой пептидной связи. А. Центроид основного кластера окружения пептида ErmBL в объединенных траекториях без эритромицина. В. Центроид основного кластера окружения пептида ErmBL в первой траектории с эритромицином. С. Центроид основного кластера окружения пептида ErmBL во второй траектории с эритромицином. D. Центроид основного кластера окружения пептида ErmBL в третьей траектории с эритромицином

В частности, эритромицин «давит» на стопку A2058||A2059||m2A2503||G2061||C2063 и фиксирует ее в положении максимального взаимодействия с H74 непосредственно рядом с ПТЦ. Это воздействие заметно смещает саму спираль H74.

Но это не единственное различие в структуре связывания А-тРНК с рибосомой. При всех переходах изменялись взаимодействия локтя А-тРНК с A896 H38 23S рРНК, именуемой также A-site finger: если в отсутствие эритромицина остаток A896 образовывал стэкинг-контакт преимущественно с G19 А-тРНК (рис. 3А) на самой вершине локтя, то при наличии эритромицина в системе контакт смещался к его уотсон-криковскому партнеру C56 А-тРНК, что означает заметное вращение самой А-тРНК (рис. 3В).

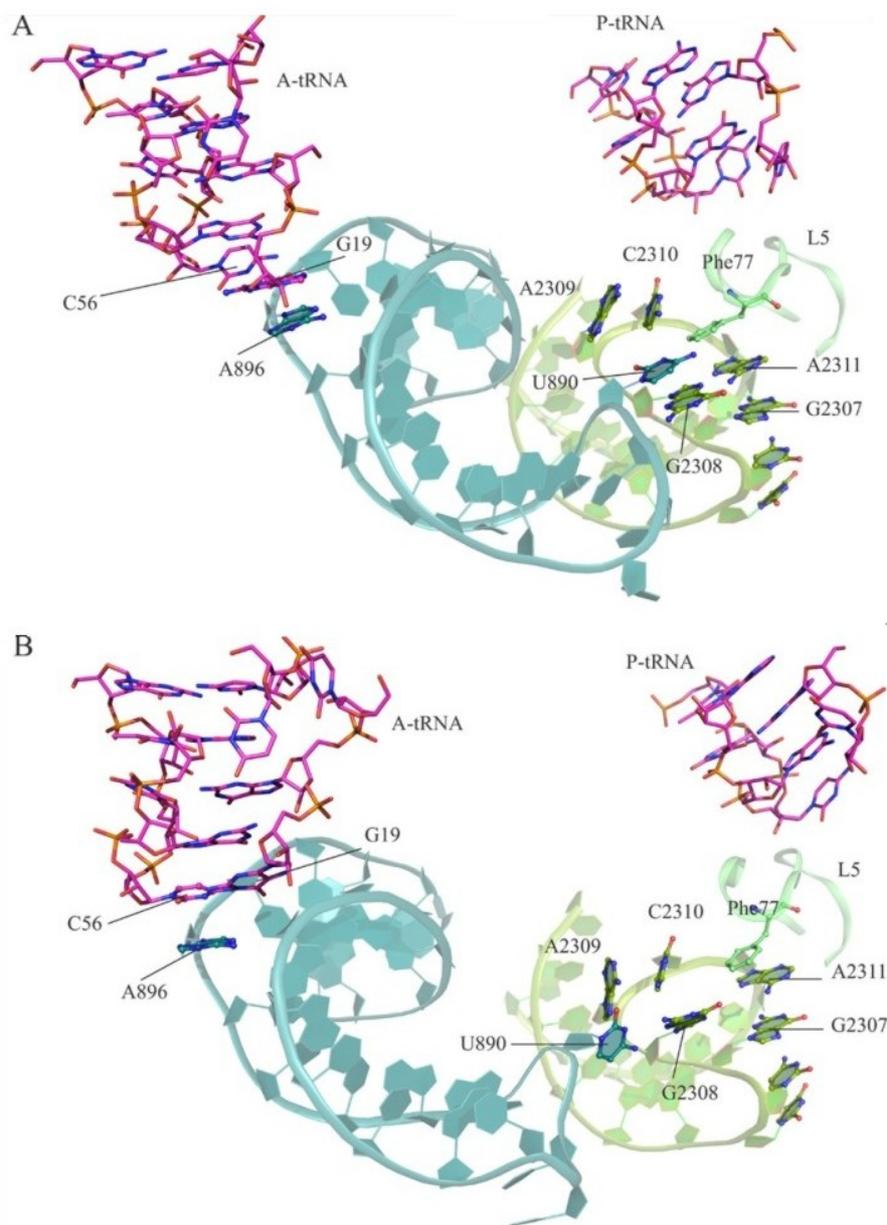


Рис. 3. Структура контакта между вершиной H38 (ASF) и H84 в траекториях, содержащих ErmBL.
А. Центроид основного кластера окружения контакта H38/H84 в первой (лучшей по расстоянию С–N) траектории без эритромицина. В. Центроид основного кластера окружения контакта H38/H84 в объединенных траекториях с эритромицином

Изменение взаимодействий локтя А-тРНК с вершиной H38 (или ASF, A-site finger) происходит на фоне изменений структуры этой вершины, ее как внутренних, так и внешних взаимодействий прежде всего со спиралью H84. Эти две спирали образуют любопытный контакт, который

функционально важен: если вершина H38 связывает локоть A-тРНК, то H84 через тонкую прослойку фрагмента белка L5 контактирует с локтем P-тРНК. При локте P-тРНК вершина H84 формирует стопку оснований, куда встраивается Phe77 белка L5: A2309||C2310||Phe77||A2311||G2307||C2306||U2305, при этом основание G2308 может выпетливаться и контактировать с выпетливающимся из ASF U890. В исходной структуре и в некоторых участках траектории с эритромицином (например, в состоянии I, IIa) эти выпетливающие остатки сблизились так, что могли образовать водородную связь (см. рис. 3B). В других структурах с эритромицином этот контакт и вовсе полностью расшелся. В структуре же без эритромицина, которую можно считать «лучшей», с наиболее хорошо сближенными субстратами ПТР, эти выпетливающие остатки образовывали прочное стэкинг-взаимодействие (см. рис. 3A). Но в целом, спирали были более сближены в траекториях без эритромицина, чем с ним. Более того, в присутствии эритромицина так или иначе нарушалась стопка вершины H84 при локте P-тРНК (см. рис. 3B).

Таким образом, можно заключить, что присутствие эритромицина в туннеле приводит к нарушению контактов вершин H38 и H84 и, как следствие, нарушению взаимного позиционирования A- и P-тРНК. Что касается аллостерического взаимодействия ПТЦ и ASF, то оно возможно, так как большой рычаг спирали H38 основанием уходит в область, близкую к ПТЦ со стороны спирали H74, которая смещается под воздействием эритромицина.

Также стоит упомянуть, что структура вершины H38 плохо различима в структурах рибосомы, полученных методом рентгеноструктурного анализа, и крайне разупорядочена в структурах, полученных методом криоэлектронной микроскопии, и эта ситуация не меняется даже при большом разрешении метода [18]. Причем известно, что функциональное значение этой спирали заключается не только в поддержании связывания A-тРНК: анализ данных мутагенеза и химического зондирования дает основания полагать, что эта спираль участвует в передаче аллостерического сигнала между различными функциональными центрами, включая ПТЦ и центр связывания элонгационных факторов [19]. Нечеткость структурных данных говорит о том, что у структуры H38 и ее контактов с H84 есть не одно конформационное состояние, которое зависит от состояния рибосомы в целом. В большинстве структур эти спирали не взаимодействуют, но при запуске молекулярной динамики контакты между ними образуются даже там, где их не было: в частности, при получении структуры A/A, P/P-состояния рибосомы из преакомпадного состояния (PDB ID: 5AFI) контакты между U890 H38 и G2308, G2309 H84 формировались по мере постадийной оптимизации структуры со вписанной в нее A-тРНК, несмотря на то, что U890 в исходной структуре находилась во внутриспиральных стэкинг-взаимодействиях.

Очевидно, что данное взаимодействие между H38 и H84 имеет особое влияние на взаимное расположение тРНК, в том числе в ПТЦ. Изменение этих взаимодействий меняет даже основание A-тРНК, с которым взаимодействует ASF. С другой стороны, структурные данные по контактам этих спиралей вызывают вопросы. Следовательно, для получения более четких картин комплексов рибосомы с различным состоянием ПТЦ (как активным, так и «выключенным») понадобится уточнение возможных структур этого участка 23S рРНК.

Заключение

Смоделирован комплекс рибосомы в каноническом A/A, P/P состоянии, содержащий стоп-пептид EtmVL как в присутствии антибиотика эритромицина, так и без него. Связывание эритромицина в рибосомном туннеле провоцирует значительное расхождение субстратов пептидилтрансферазной реакции, и таким образом, ингибирует ее. Разупорядочивание субстратов ПТР друг относительно друга связано с изменением паттерна связывания A-тРНК рибосомой, что проявляется как в A-сайте недалеко от ПТЦ, так и в области локтя A-тРНК, образующего стэкинг-контакт со спиралью H38 23S рРНК. Вершина этой спирали не разрешена в исходной структуре, как и во многих других структурах рибосомы, однако ее конформация и контакты как с A-тРНК, так и со спиралью H84 имеют значимое влияние на расположение A-тРНК в целом, и, как следствие, стабилизацию или разрушение предреакционного состояния пептидилтрансферного центра. Это необходимо иметь в виду при моделировании структур рибосом, где важно понять состояние ПТЦ, для чего необходимо производить дополнительную оптимизацию спирали H38 перед запуском основного расчета молекулярной динамики.

Список источников

1. Hahn J., Grandi G., Gryczan T.J. et al. // *Molecular and General Genetics* MGG. 1982. V. 186, No. 2. P. 204. DOI: 10.1007/bf00331851.
2. Arenz S., Ramu H., Gupta P. et al. // *Nature Communications*. 2014. V. 5, No. 1. DOI: 10.1038/ncomms4501.
3. Arenz S., Bock L.V., Graf M. et al. // *Nature Communications*. 2016. V. 7, No. 1. DOI: 10.1038/ncomms12026.
4. Cannone J.J., Subramanian S., Schnare M.N. et al. // *BMC Bioinformatics*. 2002. V. 3, No. 1. P. 1-31. DOI: 10.1186/1471-2105-3-2.
5. Brilot A.F., Korostelev A.A., Ermolenko D.N. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. V. 110, No. 52. P. 20994. DOI: 10.1073/pnas.1311423110.
6. Fischer N., Neumann P., Konevega A.L. et al. // *Nature*. 2015. V. 520, P. 567. DOI: 10.1038/nature14275.
7. Polikanov Y., Steitz T., Innis C. // *Nature Struct. Mol. Biol.* 2014. V. 21, P. 787. DOI: 10.1038/nsmb.2871.
8. Joung I.S., Cheatham T.E. // *J. Phys. Chem. B*. 2008. V. 112, No. 30. P. 9020. DOI: 10.1021/jp8001614.
9. Athavale S., Petrov A., Hsiao C. et al. // *Plos One*. 2012. V. 7, P. 1. DOI: 10.1371/journal.pone.0038024.
10. van der Spoel D., Lindahl, E., Hess B. et al. // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26, P. 1701. DOI: 10.1002/jcc.20291.
11. van der Spoel D., Lindahl E., Hess B. et al. // *J. Chem. Theory Comput.* 2008. V. 4, P. 435. DOI: 10.1021/ct700301q.
12. Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K. et al. // *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2015. V. 11, No. 8. P. 3696. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00255.
13. Bayly C.I., Cieplak P., Cornell W. et al. // *J. Phys. Chem.* 1993. V. 97, No. 40. P. 10269. DOI: 10.1021/j100142a004.
14. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. // *J. Chem. Phys.* 2007. V. 126, P. 014107. DOI: 10.1063/1.2408420.
15. Berendsen H., Postma J., van Gunsteren W. et al. // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81, P. 3684. DOI: 10.1063/1.448118.
16. Darden T., York D., Pedersen L. // *J. Chem. Phys.* 1993. V. 98, P. 10089. DOI: 10.1063/1.464397.
17. Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C. et al. // *J. Comput. Chem.* 1997. V. 18, No. 12. P. 1463. DOI: 10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H
18. Watson Z.L., Ward F.R., Meheust R. et al. // *eLife*. 2020. V. 9. DOI: 10.7554/elife.60482.
19. Sergiev P.V., Kiparisov S.V., Burakovsky D.E. et al. // *Journal of Molecular Biology*. 2005. V. 353, No. 1. P. 116. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.08.006.
20. Shishkina A.V., Makarova T.M., Tereshchenkov A.G., Makarov G.I., Korshunova G.A., Bogdanov A.A. // *Biochemistry (Moscow)*. 2015. V. 80, No. 11. P. 1500–1507.
21. Wang S., Jiang K., Du X., Lu Y., Liao L., He Z., He W. // *Frontiers in Microbiology*. 2021. Vol. 12. 690744. doi: 10.3389/fmicb.2021.690744.

Макарова Татьяна Михайловна – кандидат химических наук, младший научный сотрудник НИЛ «Многомасштабное моделирование многокомпонентных функциональных материалов», Южно-Уральский государственный университет, Челябинск, Россия. E-mail: makarovatm@susu.ru.

*Статья поступила в редакцию 12 декабря 2023 г.
The article was submitted 12 December 2023.*