

УДК 577.217.347;57.052.2;544.165;51-76

ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА 2,8-ДИМЕТИЛИРОВАНИЯ A2503 23S рРНК *E. coli* МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

© 2020 Т.М. Макарова*, Г.И. Макаров

Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет),
454080 Челябинск, Россия; электронная почта: makarovatm@susu.ru

Поступила в редакцию 16.06.2020

После доработки 01.10.2020

Принята к публикации 02.10.2020

Рибосома – это молекулярная машина, синтезирующая все клеточные белки. Она также является мишенью около половины клинически используемых антибиотиков. Один из способов защиты от антибиотиков заключается в адаптивной химической модификации остатков рибосомальных РНК. Любопытным примером такой модификации служит 2,8-диметилирование A2503 23S рРНК, вызывающее устойчивость к фениколам, линкозамидам, оксазолидинонам, плевомутилинам и некоторым макролидам. В настоящей работе методом молекулярно-динамического моделирования исследовалось, как 2,8-диметилирование A2503 влияет на конформации и подвижность нуклеотидных остатков 70S рибосом *Escherichia coli*. Значительные изменения были выявлены как в непосредственном окружении остатка A2503 23S рРНК, так и глубже в рибосомном туннеле (РТ) среди остатков, о которых известно, что они вовлечены в процесс передачи сигнала от антибиотиков, связывающихся в РТ, к пептидилтрансферному центру. Эти изменения смещают рибосому в сторону состояния А/А,Р/Р из конформационно иного состояния, в нашем примере – это состояние Р/Р,Е/Е. Это позволяет заключить, что эффект модификации m²m⁸A2503 состоит в дополнительной стабилизации состояния А/А,Р/Р, способствующего пептидилтрансферной реакции (ПТР) в противоположность действию антибиотиков – ингибиторов ПТР.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибосома, устойчивость, антибиотики, A2503, молекулярная динамика.

DOI: 10.31857/S0320972520110135

ВВЕДЕНИЕ

Рибосома – это крупный рибонуклеопротеидный комплекс, который синтезирует все клеточные белки по программе, доставляемой матричной РНК. Будучи одним из ключевых элементов живой клетки, эта древняя молекулярная машина содержит универсально консервативные структурные элементы, построенные из рибосомной РНК (рРНК), которые в природных условиях сравнительно редко подвергаются мутациям [1]. Это обстоятельство, наряду с присутствием множества копий рибосомальной РНК в геномах живых организмов, сделало рибосому удобной мишенью для разнообразных антибиотиков [2]. Примерно половина антибиотиков, используемых сегодня в клинической практике, являются ингибиторами синтеза бел-

ка на рибосоме. Тем не менее число патогенных микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, связывающимся с рибосомой, растёт с каждым годом [2, 3].

Один из механизмов устойчивости бактериальной рибосомы к действующим на неё антибиотикам состоит в химической модификации остатков рРНК, локализованных преимущественно в функциональных центрах рибосомы [4], и эти модификации, как правило, заключаются в дополнительном неконститутивном метилировании того или иного остатка рРНК [5]. Пример этого – метилирование остатка A2503 (здесь и ниже используется нумерация, принятая для рРНК *Escherichia coli*) 23S рРНК большой субъединицы бактериальной рибосомы по положению C8, осуществляемое метилтрансферазой Cfr [6], впервые обнаруженной в *Staphylococcus sciuri* [7], относящейся к семейству так называемых радикальных SAM-метилтрансфераз (SAM – S-аденозил-L-метионин) [8]. В рибосоме бактерий дикого типа остаток A2503 подвержен конститутивному метилированию по положению C2, осуществляемому метилтрансферазой RlmN; совместное действие этих метил-

Принятые сокращения: МД – молекулярная динамика; ПТР – пептидилтрансферная реакция; ПТЦ – пептидилтрансферный центр; РТ – рибосомный туннель; рРНК – рибосомная РНК; RMSD – среднеквадратическое отклонение от заданной структуры.

* Адресат для корреспонденции.

трансфераз приводит к диметилированию A2503 и превращению его в m^2m^8A2503 .

Дополнительная химическая модификация приводит к устойчивости бактерий к антибиотикам разных семейств (фениколам, линкозамидам, оксазолидинонам, плевромутилинам и стрептограминам А), связывающимся с пептидилтрансферазным центром (ПТЦ) рибосомы и примыкающей к нему верхней части рибосомного туннеля (РТ). Данный тип устойчивости именуется PhLOPS_a резистентностью по первым буквам названий перечисленных семейств. Появление у рибосомы столь ярко выраженной множественной лекарственной устойчивости, как правило, объясняют тем, что дополнительная метильная группа в m^2m^8A2503 создаёт прямые стерические затруднения для связывания того или иного антибиотика со своим сайтом [10]. Впрочем, необходимо заметить, что пространственная структура рибосомы с диметилированным остатком A2053 неизвестна, а детальный структурный анализ комплексов модифицированной таким образом рибосомы с антибиотиками до сих пор не проводился.

Консервативный нуклеотидный остаток m^2A2503 соединяет два одноцепочечных тяжа рРНК, формирующих так называемые стенки туннеля. При этом остаток m^2A2503 вклинивается в цепочку нуклеотидов между A2059, с одной стороны, и G2061 – с другой, в то время как A2060 выпетливается из стопки. Эта цепочка из остатков 2058–2062 23S рРНК, как считается, образует путь передачи сигналов из внешних сайтов РТ в ПТЦ [11–13].

Для изучения воздействия диметилирования A2503 на структуру рибосомы мы задействовали метод моделирования молекулярной динамики (МД), успешно применяемый для описания динамических аспектов структуры и функционирования рибосомы [13]. Было исследовано влияние 8-метилирования m^2A2503 как на А/А, Р/Р-состояние рибосомы, предшествующее пептидилтрансферазной реакции (ПТР), так и на состояние Р/Р, Е/Е, по ряду сведений, аллостерически антагонистическое первому состоянию [14, 15].

В настоящей работе были смоделированы комплексы целой 70S рибосомы *E. coli* в обоих функциональных состояниях с двумя вариантами профиля метилирования остатка A2503 для дальнейшего использования в расчётах МД. Было изучено влияние модификации резистентности на конформацию и нековалентные связи остатков рРНК, и наибольшие конформационные изменения были обнаружены у достаточно удаленных от A2503 остатков U2609 и U1782, а также расположенного еще глубже по рибосом-

ному туннелю A751. Все эти остатки, согласно экспериментальным данным, участвуют в ряде случаев передачи сигнала из РТ в ПТЦ при остановке трансляции антибиотиками и так называемыми стоп-пептидами (stalling peptides), и они связаны с m^2m^8A2503 через сеть нековалентных взаимодействий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделируемая система. Исходным конструктом для моделируемых систем была выбрана структура рибосомы *E. coli*, полученная методом криоэлектронной микроскопии с разрешением от 2,9 Å (код PDB: 5AFI) [10]. В эту структуру комплекса рибосомы с деацелированной E-тРНК^{fMet}, fMet-P-tRNA^{fMet} и Phe-A/T-tРНК^{Phe} в составе тройного комплекса с EF-Tu, GTP и кирромицином добавили недостающие модифицированные основания в соответствии со сведениями из банка данных [16].

Ранее нами уже был описан протокол получения из структуры 5AFI комплексов рибосомы, стабильно и воспроизводимо связывающих тРНК как в А/А- и Р/Р-сайтах, так и в Р/Р- и Е/Е-сайтах [17]. Упомянем лишь, что этот протокол содержит минимум три коротких расчёта МД с поэтапным снятием позиционных ограничений с различных частей системы. Системы с m^2m^8A2503 были сделаны на их основе, и расчёту МД предшествовала минимизация энергии сочетанием метода наискорейшего спуска с алгоритмом Бройдена–Флетчера–Гольдфарба–Шанно с ограниченным использованием памяти [18].

Условия моделирования. Все расчёты МД и анализ полученных траекторий проводили с использованием пакета GROMACS [19, 20] версии 5.1.4 и силового поля AMBER-14SB [21].

Топологии, оптимизация геометрии и молекулярных электростатических потенциалов неканонических остатков РНК и остатков аминокислот, связанных с 3'-концом тРНК, были получены с помощью квантово-химических расчётов. Предварительная оптимизация вновь параметризуемых остатков осуществлялась с помощью программы ПРИРОДА [22, 23] методом DFT с функционалом mPBE [24] и базисным набором L1 [25]. Оптимизация завершалась по выполнению 300 шагов или достижению градиентом значения ниже 10^{-6} Хартри/Бор. Окончательная оптимизация геометрии остатка и расчёт его электростатического потенциала выполнялся в пакете FIREFLY [26, 27] методом Хартри–Фока с базисом 6–31G*. Оптимизация также прекращалась по выполнению 300 шагов или

достижению градиентом значения ниже 10^{-6} Хартри/Бор.

Все моделирования МД выполнялись при температуре 310 К (температурном оптимуме *E. coli*) с периодом привязки 0,1 пс под управлением термостата масштабирования скоростей с добавочным стохастическим членом [28] и периодическими граничными условиями с изотропным постоянным давлением, поддерживаемым баростатом Берендсена [29] с периодом привязки 5 пс. Электростатические взаимодействия обрабатывались посредством сети частиц Эвальда [30] с шагом сетки 0,125 нм и четвертым порядком интерполяции. Моделируемая система была центрирована в орторомбической ячейке с рёбрами $24 \times 27 \times 25$ нм, заполненной молекулами воды TIP4P_{ew} так, что окончности рибосомы от границ ячейки отделял слой растворителя минимум 1,5 нм. Отрицательный заряд системы был нейтрализован ионами калия с оптимизированными Ван-дер-Ваальсовыми параметрами [31] вкуче с видимыми с помощью криоэлектронной микроскопии структурными ионами магния. Нейтрализованная система содержала 100 мМ KCl и 6 мМ MgCl₂ в виде ионов.

Временной шаг интегрирования во всех вычислениях составлял 2 фс, координаты записывались в файл траектории каждые 15 пс.

Методы анализа траекторий. Анализ нековалентных взаимодействий и конформаций остатков РНК осуществлялся для отрезков траекторий после 100 нс расчётов, когда среднеквадратическое отклонение от заданной структуры (RMSD) и потенциальная энергия стабилизировались.

Водородные связи анализировались с помощью встроенных возможностей GROMACS: в каждом кадре траектории наличие или отсутствие конкретной связи определялось геометрическими параметрами:

- атом-донор водорода и атом-акцептор разделены расстоянием не более 3,5 Å;
- угол водород-донор-акцептор меньше 30°.

Также геометрические параметры были введены для распознавания стэкинг-взаимодействий азотистых оснований остатков РНК, для чего вычислялся центр азотистого основания (среднее арифметическое координат атомов C2, C4 и C6 для пиримидинов и N1, N3 и C8 для пуринов) и уравнение плоскости по трём этим точкам. Стэкинг-взаимодействие в кадре записывалось, если:

- расстояние между центрами не превышало 5,5 Å;
- угол между плоскостями азотистых оснований не превышал 30°;

- угол между плоскостью первого азотистого основания и отрезком, соединяющим геометрические центры, составлял как минимум 45°; без этого условия компланарная пара оснований (например, уотсон-криковская) была бы ошибочно распознана как пара стэкинг-взаимодействия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дополнительная метильная группа приводила к усилению стэкинг-взаимодействий m²m⁸A2503 с соседними основаниями. Остаток m²A2503 23S рРНК, располагаясь на тяжё между спиральными структурами H89 и H90, вклинивается в стопку стэкинг-взаимодействий аналогичного одноцепочечного тяжё между H73 и H74 с образованием неспаренной стопки C2063–G2061–m²A2503–A2059–A2058. При этом A2060 из основного тяжё тоже выпетливается и образует третичные стэкинг-взаимодействия с G2502 – основание-сосед исследуемого m²A2503.

Мы воспользовались ранее полученными системами и траекториями [17] следующих типов, чтобы внедрить в них модификацию m²m⁸A2503 и изучить её конформационное воздействие на своё окружение, каждая из которых в дальнейшем будет упоминаться в виде аббревиатуры. Эти аббревиатуры обозначают следующее:

- PE – комплекс рибосомы с fMet–P–тРНК^{fMet} и деацелированной E–тРНК^{fMet};
- AP – комплекс рибосомы с Ala–A–тРНК^{Phe} и fMet–P–тРНК^{fMet}.

Получение исходных AP- и PE-систем подробно описано в нашей предыдущей работе [17]. Тогда из этих систем было получено по 4 траектории длиной 200 нс для каждого функционального состояния рибосомы. После добавления метильной группы в остаток m²A2503 23S рРНК по 8-му положению мы удостоверились, что система быстро достигает стабильного состояния: рост RMSD прекращается до 60–80 нс (рис. 1), а колебания потенциальной энергии практически сразу исчерпывают какое-либо направленное движение (рис. 2).

Поэтому, как и в предыдущих расчётах систем AP и PE с обычным m²A2503, для анализа были взяты последние 100 нс каждой из траекторий. Встречаемости водородных связей и стэкинг-взаимодействий азотистых оснований остатков рРНК во вновь полученных траекториях, как и для канонических AP- и PE-состояний рибосом, были рассчитаны по последним 100 нс с вычислением среднего значения и стандартного отклонения по 4 значениям для каждого типа системы.

Наиболее непосредственным эффектом модификации оказалось усиление способности к стэкинг-взаимодействию основания m^2m^8A2503 со своими соседями – G2061 и A2059 (рис. 3). Это небольшое изменение в конформациях и силе взаимодействий приводит к разрушению стэкинг-взаимодействия соседнего остатка G2502 с A2060, из-за чего последний образует такое взаимодействие преимущественно с U1255 (таблица).

Кроме того, стабилизация положения остатка A2503 23S рРНК и перераспределение электронной плотности в нем способствуют значительному увеличению встречаемости водородной связи его с аденином остатка A2062, совершенно исключая встраивание A2062 между G2061 и C2063, как это происходит во многих кадрах траекторий рибосомы в состоянии AP.

И все же перечисленные изменения касаются только непосредственных соседей остатка A2503 и не распространяются ниже в РТ или выше до ПТЦ. Таким образом, модификация m^2m^8A2503 не вызывает существенных возмущений AP-состояния рибосомы помимо непосредственной окрестности диметилированного остатка.

Удаленные конформационные изменения в РТ и других сайтах рибосомы, индуцированные введением m^2m^8A2503 . Итак, дополнительное неконститутивное метилирование остатка A2503 23S рРНК приводит к перераспределению связей в области третичных контактов двух одноцепочечных участков близ ПТЦ. Это воздействие, как выяснилось, может передаваться глубже в РТ – туда, где вновь синтезированная пептидная цепь должна взаимодействовать с рибосомой.

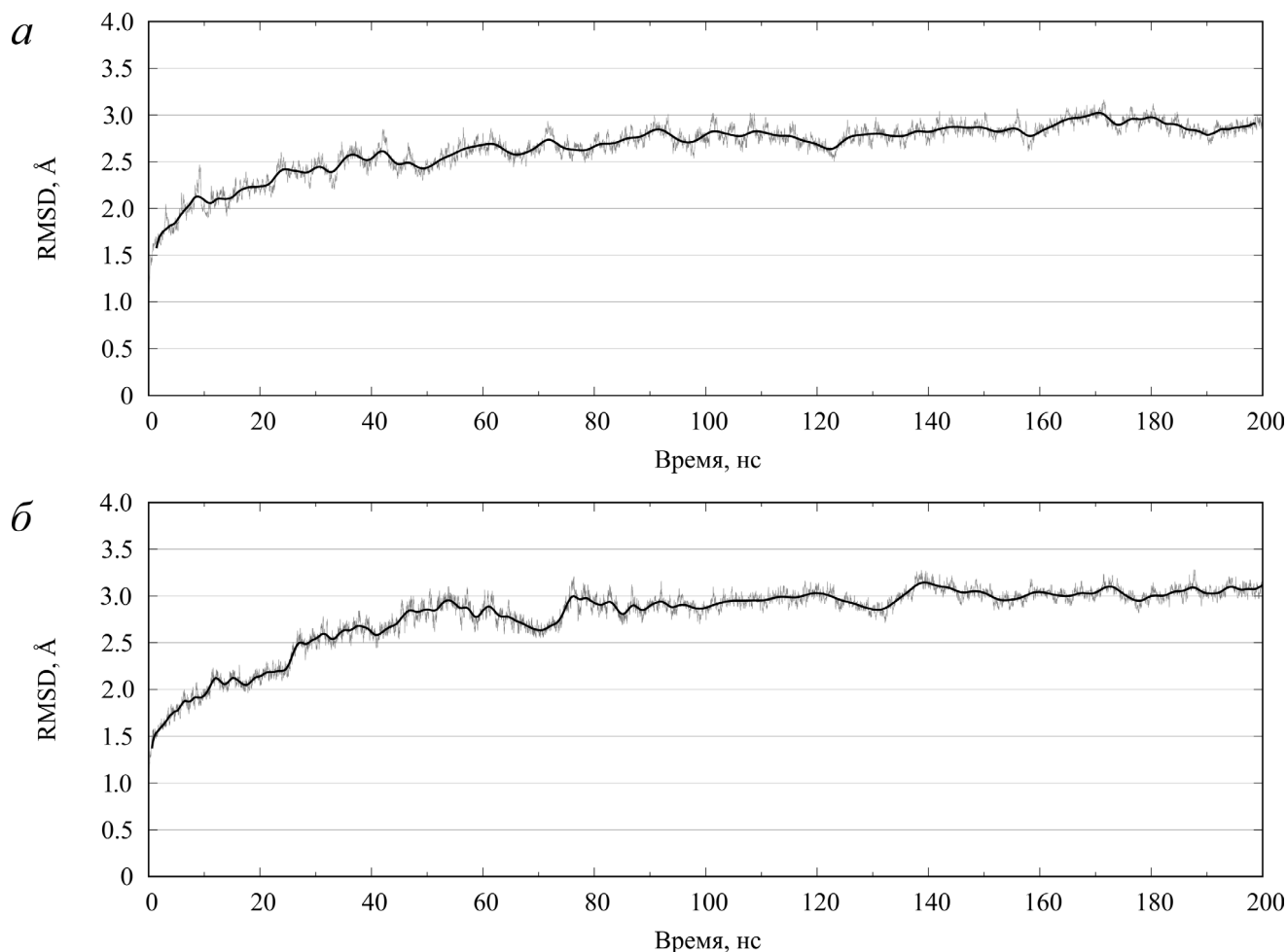


Рис. 1. Изменение RMSD рибосомы при расчёте МД после добавления модифицированного остатка m^2m^8A2503 : показано на примере одной из 4-х траекторий длиной 200 нс для каждого типа системы. Непосредственные значения показаны бледно-серым цветом на фоне скользящего среднего по 100 точкам, начерченного сплошной черной линией, сглаженной методом кривых Безье. *a* – AP-состояние. *б* – PE-состояние

Связи, стабильно и воспроизводимо изменяющиеся в основном кластере 23S рРНК при добавлении 8-метильной группы к m²A2503

Взаимодействие	AP дикий тип	AP m ² m ⁸ A2503	PE дикий тип	PE m ² m ⁸ A2503
G2061 m ² A2503	33,8 ± 25,4	38,0 ± 33,5	15,4 ± 17,4	84,6 ± 3,8
A2062/N ⁶ -H...m ² A2503/N ⁷	8,3 ± 9,6	55,8 ± 40,5	37,3 ± 36,1	12,4 ± 24,9

Основные изменения в AP-состоянии

A2060 G2502	33,0 ± 23,0	7,3 ± 14,4	26,9 ± 33,9	0,1 ± 0,2
U1255 A2060	34,5 ± 30,8	55,4 ± 19,5	23,1 ± 28,1	21,6 ± 32,6
G830/N ¹ -H...A2448/N ⁷	44,6 ± 12,0	0,1 ± 0,3	0 ± 0	0 ± 0
C961 A2031	0,2 ± 0,3	38,8 ± 19,7	72,7 ± 2,2	61,1 ± 15,4
C2499/N ⁴ -H...G2454/O ⁶	6,1 ± 7,1	70,5 ± 45,7	13,8 ± 11,4	22,0 ± 20,6
G2454/N ² -H...C2499/O ²	3,5 ± 7,1	67,6 ± 41,7	0 ± 0	0 ± 0
G2454/N ¹ -H...C2499/N ³	3,4 ± 6,7	68,9 ± 45,1	0 ± 0	0 ± 0
A2453/N ⁶ -H...U2500/O ⁴	7,0 ± 14,1	89,8 ± 5,0	0 ± 0	1,9 ± 3,2
U2500/N ³ -H...A2453/N ¹	8,0 ± 15,9	62,6 ± 37,4	0 ± 0	12,5 ± 17,5
G2454 G2455	90,4 ± 11,9	19,2 ± 35,9	93,4 ± 2,6	89,1 ± 4,0
Ψ2504/N ¹ -H...G2447/O ⁶	14,8 ± 12,4	61,9 ± 31,4	0 ± 0	0 ± 0
Cm2498/N ⁴ -H...C2499/N ³	0 ± 0	20,6 ± 3,6	0,8 ± 1,6	0 ± 0
Cm2498 C2499	37,4 ± 11,8	72,5 ± 19,5	84,5 ± 12,4	78,8 ± 23,4
A945/N ⁶ -H...A2448/N ³	25,7 ± 13,5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
U2500 Ψ2504	13,3 ± 7,9	66,2 ± 22,6	1,4 ± 2,8	10,0 ± 18,0
G830 A945	70,0 ± 7,8	20,1 ± 34,8	0,1 ± 0,2	0,3 ± 0,3
G2446/N ² -H...D2449/O ²	12,6 ± 4,0	41,5 ± 23,8	84,5 ± 6,4	61,6 ± 42,6
C2452/N ⁴ -H...Ψ2504/O ²	3,8 ± 7,5	56,1 ± 26,4	25,6 ± 48,2	48,2 ± 40,5

Изменения в PE-состоянии в РТ

A1783/N ⁶ -H...A2587/O ₂	7,4 ± 14,8	5,1 ± 10,2	23,1 ± 32,2	68,0 ± 6,0
U1779/N ³ -H...G2588/O ₂	13,0 ± 13,1	9,7 ± 9,8	64,1 ± 42,9	0,5 ± 0,6
A1785/N ⁶ -H...U1779/O ⁴	0 ± 0	0 ± 0	81,3 ± 9,0	20,1 ± 22,1
A783/O ² -H...U1779/O ²	39,8 ± 27,0	32,2 ± 22,2	62,0 ± 41,5	0,1 ± 0,1
A751 A789	0 ± 0	0,1 ± 0,3	33,0 ± 29,5	0 ± 0,1
U1782 U2609	94,8 ± 4,5	92,1 ± 9,0	84,4 ± 13,7	40,1 ± 30,0
A781/O ² -H...C1788/O ²	3,3 ± 4,0	2,8 ± 2,6	1,1 ± 2,2	23,0 ± 17,1

Взаимодействие	AP дикий тип	AP m ² m ⁸ A2503	PE дикий тип	PE m ² m ⁸ A2503
Изменения в PE-состоянии в окрестности E-сайта				
U2075/N ³ –H...A2435/N ¹	1,5 ± 3,0	0 ± 0	6,1 ± 5,6	52,5 ± 29,5
U2074/N ³ –H...G2597/N ³	0 ± 0	0 ± 0	38,3 ± 11,2	61,4 ± 5,7
U200/N ³ –H...G248/O ₄	8,3 ± 16,6	6,9 ± 10,2	69,0 ± 8,5	44,1 ± 9,9
U2076 U2596	79,3 ± 13,7	66,5 ± 19,7	60,7 ± 7,5	32,1 ± 4,6
A197/N ⁶ –H...A2430/O ₂	57,9 ± 8,0	64,0 ± 19,1	52,8 ± 35,4	4,1 ± 4,3
U2431/O ₂ –H...A2433/N ⁷	0 ± 0	0 ± 0	54,4 ± 20,9	8,1 ± 13,0
G2436/N ² –H...U2074/O ⁴	0 ± 0	0 ± 0	6,5 ± 7,8	48,7 ± 23,3
U2075/N ³ –H...A2077/N ⁷	88,1 ± 12,2	95,2 ± 2,2	58,3 ± 9,1	21,5 ± 22,1
A2077/N ⁶ –H...U2075/O ⁴	31,7 ± 47,0	0,1 ± 0,1	98,5 ± 0,4	54,0 ± 41,4
A2435/N ⁶ –H...U2075/O ⁴	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	38,6 ± 35,8

Примечание: AP и PE обозначают рибосому с А/А–тРНК и Р/Р–тРНК либо Р/Р–тРНК и Е/Е–тРНК соответственно. Значения рассчитаны по 4-м независимым траекториям каждой из систем и представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Тросточие обозначает водородную связь, двойная вертикальная черта || – стэкинг-взаимодействие.

Наиболее явные изменения были найдены в PE-состоянии рибосомы.

Последовательность азотистых оснований C2063–G2061–m²A2503–A2059–A2058, образующих стэкинг-взаимодействия, переходит в спираль H73, начинающуюся с пар G2057–C2611 и G2057–C2612. Они ковалентно связаны с важными аллостерическими сенсорами в РТ, C2610 и U2609 [32]. В AP-состоянии остатки РТ сохраняют свою конформацию при любой степени модификации A2503, однако в PE-состоянии взаимодействие остатков U2609 и U1782 расходится, и последний занимает положение, близкое к таковому в AP-состоянии (рис. 4).

Разворот U1782 передается на U1781 и связанный с ним в стэкинг-взаимодействии A752. Это смещает A751 в положение, воспроизводящее AP-состояние (рис. 5), как это уже было отмечено с U1782, из-за чего полностью разрушается стэкинг-взаимодействие A751 и A789, что аналогично воспроизводит AP-состояние (таблица). Таким образом, только в PE-состоянии, функционально противоположном AP-состоянию, наблюдаются конформационные изменения в области РТ, воспроизводящие последнее из аллостерически антагонистических состояний. Это может означать локальную гиперстабилизацию

AP-состояния посредством данной мутации резистентности.

Кроме того, остатки U2609 и U1782 и область A751 участвуют в передаче аллостерического сигнала из РТ в ПТЦ и А-сайт, что является ключевым механизмом воздействия антибиотиков, связывающихся в рибосомном туннеле [32].

Что же касается остальной рибосомы, то изменения в РТ в целом не вызывали масштабных глобальных переконфигураций нековалентных связей в рРНК как, например, в случае мутаций, явно нарушавших её функционирование [17]. Стабильных и воспроизводимых изменений во встречаемости нековалентных взаимодействий РНК как минимум на 20% было суммарно обнаружено в 253 случаях для AP-состояния и в 296 случаях для PE-состояния (при наличии примерно 22 тыс. связей, воспроизводимых хотя бы в одном из состояний). Изменяющиеся связи были распределены по всей рибосоме, и в обоих случаях можно было выделить как минимум 2 крупных кластера, внутри которых остатки рРНК, образовавшие такую связь, отделены друг от друга не более чем тремя остатками, соединёнными стабильной связью. Первый кластер содержал участки 23S и 5S рРНК центральной области большой субъединицы рибосомы, вто-

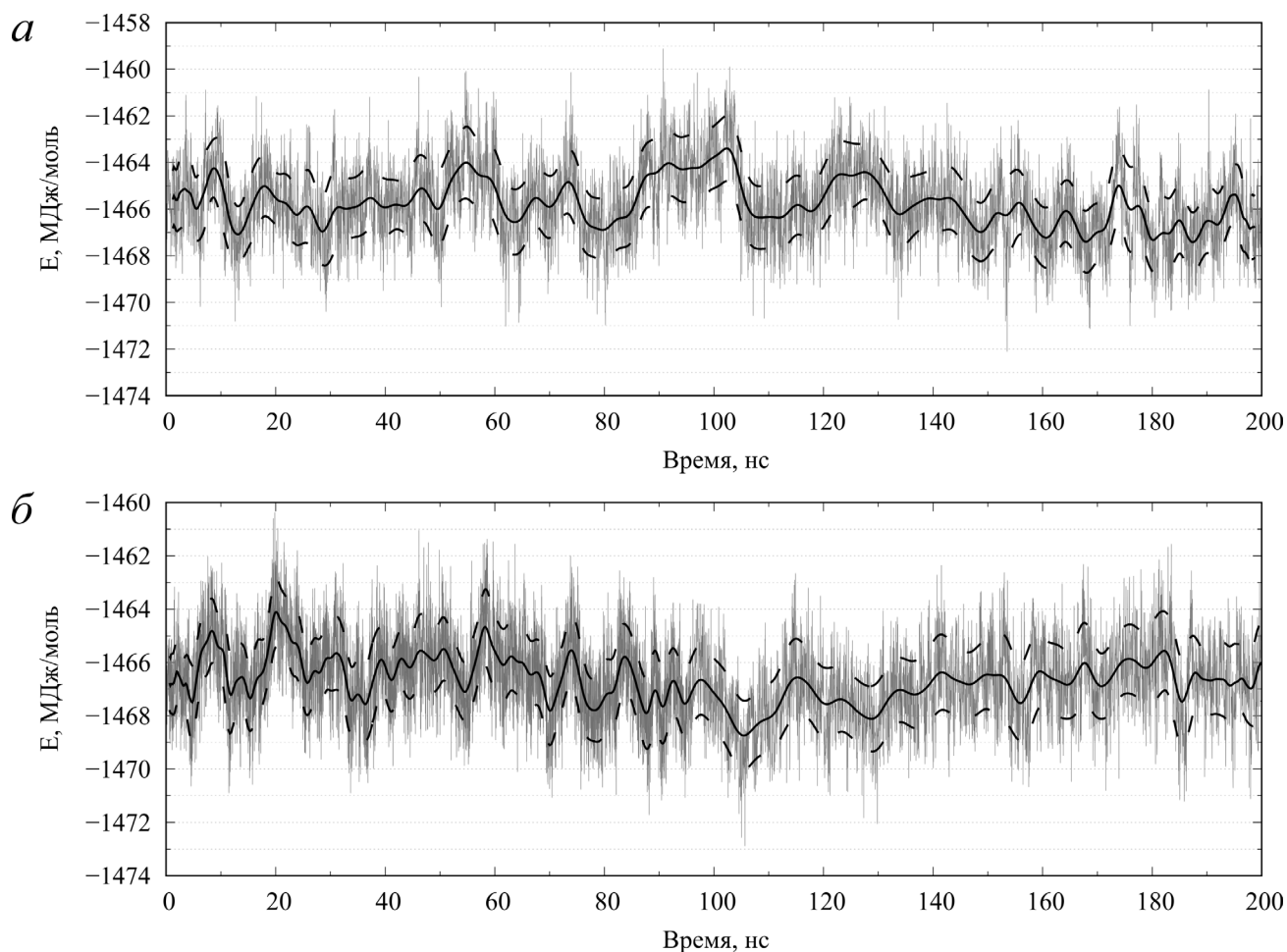


Рис. 2. Эволюция потенциальной энергии рибосомы во времени при расчёте МД после добавления модифицированного остатка m^2m^8A2503 : показано на примере одной из 4-х траекторий длиной 200 нс для каждого типа системы. Непосредственные значения показаны бледно-серым цветом на фоне скользящего среднего по 100 точкам, начерченного сплошной черной линией, сглаженной методом кривых Безье, диапазон значений в пределах скользящего стандартного отклонения ограничен пунктирными линиями. *а* – AP-состояние. *б* – PE-состояние

рой – фрагменты малой субъединицы и некоторых межсубъединичных мостов.

В самом крупном таком кластере остатков рРНК наибольшее число изменений AP-состояния модификацией m^2A2503 было обнаружено вокруг ПТЦ в спиралах Н89 и Н74, а также области их стыка, и, кроме того, около области соединения спиралей Н37 и Н39. Обнаруженные изменения касались главным образом стабилизации внутренних связей спиралей и межспиральных элементов (таблица, раздел «Основные изменения в AP-состоянии»).

В противоположность этому, в PE-состоянии перераспределения связей концентрируются вокруг универсально консервативного сочленения спиралей Н74, Н75 и Н93 (таблица, раздел «Основные изменения в PE-состоянии»),

которое непосредственно примыкает к сайту связывания остатка С75 E-тРНК – предположительным аллостерически чувствительным сайтом, связанным с E-тРНК [17]. Шпилька Н93 из упомянутого сочленения спиралей наиболее непосредственно связывает E-сайт и начало РТ. Возможно, изменения на одном из её концов также влияют на разворот стопки из двух оснований, U2609 и U1782, в положение, которое близко к таковому в AP-состоянии.

Количественные данные встречаемостей обсуждаемых выше связей указаны в таблице.

Согласно данным молекулярно-динамического моделирования систем рибосомы с конститутивным и неконститутивным метилированием остатка A2503 23S рРНК, дополнительное

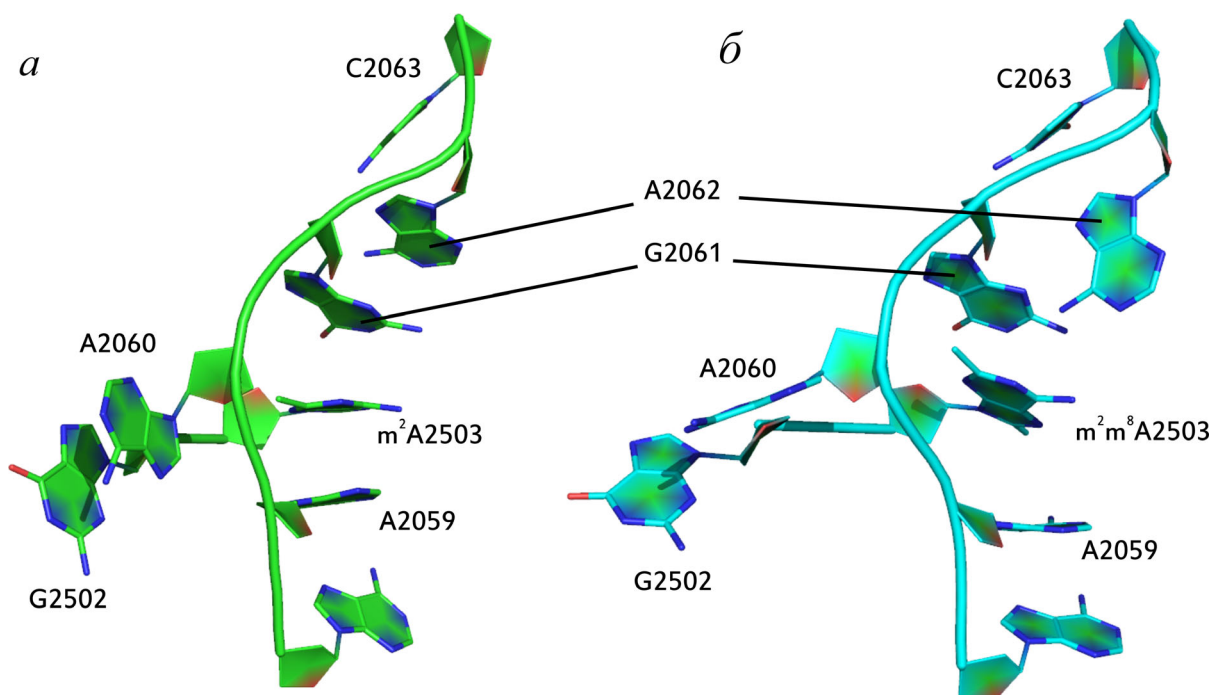


Рис. 3. Сравнение характерной конформации ближайшего окружения остатка 2503 23S рРНК при различных модификациях последнего. Дополнительное 8-метилирование остатка m^2A2503 усиливает стэкинг-взаимодействия этого остатка, но вызывает разрушение аналогичного взаимодействия G2502 с A2060. Показан кадр траектории, наиболее близкий к центру основного кластера изображенных остатков рРНК в 4-х конечных 100 нс участках из 200 нс для каждой системы. *а* – AP-состояние рибосомы дикого типа (с m^2A2503). *б* – AP-состояние рибосомы с m^2m^8A2503 . (С цветными вариантами рис. 3–5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>)

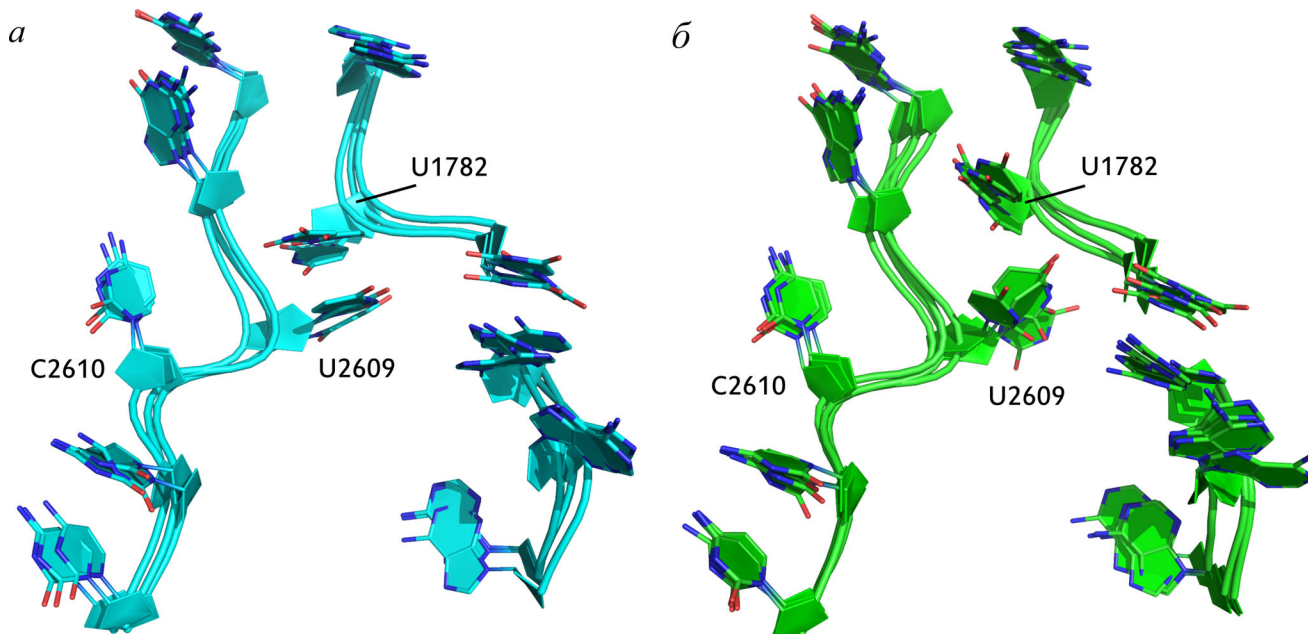


Рис. 4. Разрушение стэкинг-взаимодействия между остатками U2609 и U1782 23S рРНК в траекториях с 2,8-диметилированным A2503. На рисунке изображены наиболее заселенные кластеры остатков РТ: 3 кластера рибосомы дикого типа, которые суммарно занимают 82,1% всех кадров из 4-х траекторий и 4 кластера рибосомы с m^2m^8A2503 , которые охватывают 83,5% кадров соответственно. *а* – PE-состояние рибосомы дикого типа (с m^2A2503). *б* – PE-состояние рибосомы с m^2m^8A2503

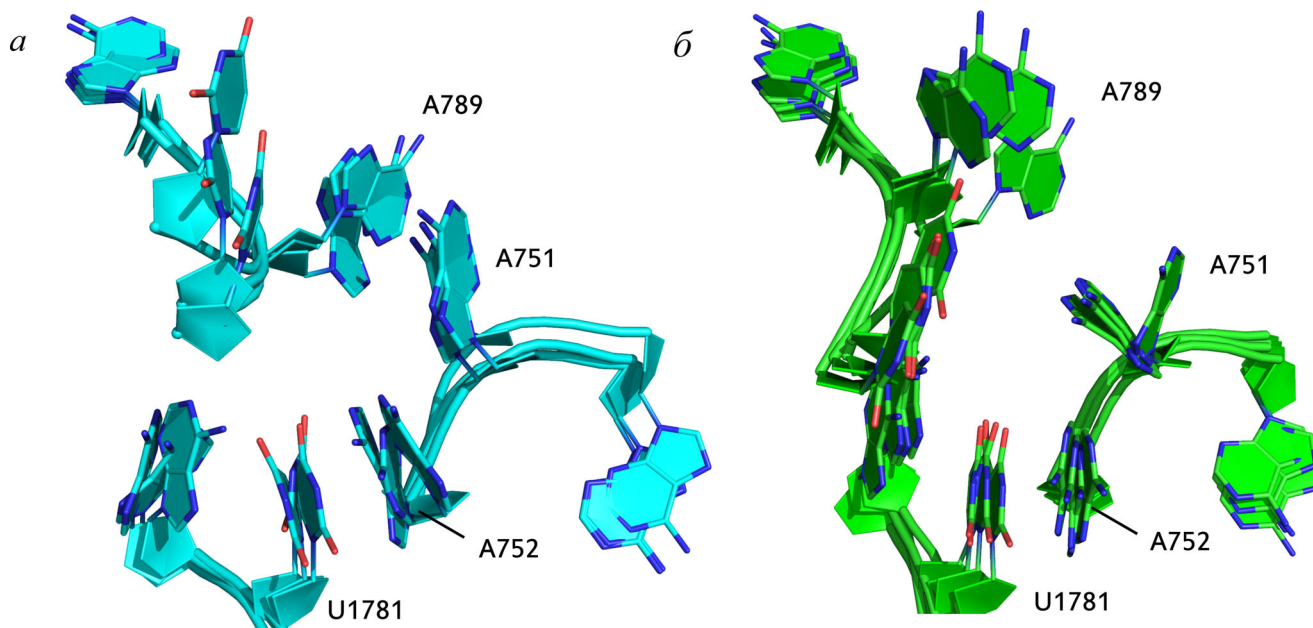


Рис. 5. Разрушение стэкинг-взаимодействия между остатками A751 и A789 23S рРНК в траекториях с 2,8-диметилированным A2503. На рисунке изображены наиболее заселенные кластеры остатков РТ: 3 кластера рибосомы дикого типа, которые суммарно занимают 82,1% всех кадров из 4-х траекторий и 4 кластера рибосомы с m^2m^8A2503 , которые охватывают 83,5% кадров соответственно. *а* – PE-состояние рибосомы дикого типа (с m^2A2503). *б* – PE-состояние рибосомы с m^2m^8A2503

8-метилирование усиливает стэкинг-взаимодействия азотистого основания A2503. Это изменение подтягивает остатки G2061 и A2059 к A2503. В результате в AP-состоянии рибосомы, предшествующем ПТР, обнаружилось лишь несколько значительных конформационных изменений и перегруппировок в непосредственном сайте модификации. Напротив, в присутствии тРНК в E-сайте конформационные перегруппировки состоялись как в самом E-сайте, так и в РТ с участием остатков, известных как важные участники аллостерического взаимодействия РТ и ПТЦ.

Таким образом, модификация m^2m^8A2503 не нарушает AP-состояния рибосомы, необходимого для протекания ПТР, но смещает антагонистичное ему состояние обратно в сторону AP-подобной конформации некоторых остатков. Отсюда следует, что объяснение широкому спектру антибиотиков с разнообразными сайтами связывания, от которых данная модификация защищает бактерии, может быть найдено в дополнительной стабилизации предшествующего ПТР состояния рибосомы. Этот факт следует принимать во внимание при дальней-

шем изучении данной модификации резистентности с антибиотиками и их стоп-пептидами.

Финансирование. Исследование было выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-00022) и Правительства Российской Федерации (резолюция № 1 от 16.03.2013, контракт № 02.A03.21.0011).

Благодарность. Авторы выражают глубокую благодарность академику РАН Богданову Алексею Алексеевичу за инициирование молекулярно-динамического исследования модификаций резистентности в рибосоме. Авторы благодарят Вычислительный центр МГУ имени М.В. Ломоносова за предоставленную возможность вести расчеты МД на суперкомпьютере «Ломоносов-II».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Соответствие этическим стандартам. Данная статья не содержит каких-либо исследований, содержащих эксперименты на людях или животных, проводимых кем-либо из авторов статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yonath, A. (2009) Ribosome: an ancient cellular nano-machine for genetic code translation, in *Biophysics and the challenges of emerging threats* (Puglisi, J. D., ed.) Springer, Netherlands, pp. 121-155, doi: 10.1007/978-90-481-2368-1_8.
2. Манькин А. (2001) Рибосомные антибиотики, *Молекулярная биология*, **35**, 597-609, doi: 10.1023/A:1010510623805.
3. McCusker, K. P., and Fujimori, D. G. (2012) The chemistry of peptidyltransferase center-targeted antibiotics: enzymatic resistance and approaches to countering resistance, *ACS Chem. Biol.*, **7**, 64-72, doi: 10.1021/cb200418f.
4. Wilson, D. N. (2014) Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance, *Nat. Rev. Microbiol.*, **12**, 35-48, doi: 10.1038/nrmicro3155.
5. Vester, B., and Long, K. S. (2009) Antibiotic resistance in bacteria caused by modified nucleosides in 23S ribosomal RNA, in *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution* (Grosjean, H. ed.) Landes Bioscience, Austin, USA.
6. Giessing, A. M. B., Jensen, S. S., Rasmussen, A., Hansen, L. H., Gondela, A., Long, K., Vester, B., and Kirpekar, F. (2009) Identification of 8-methyladenosine as the modification catalyzed by the radical SAM methyltransferase Cfr that confers antibiotic resistance in bacteria, *RNA*, **15**, 327-336, doi: 10.1261/rna.1371409.
7. Schwarz, S., Werckenthin, C., and Kehrenberg, C. (2000) Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 2530-2533, doi: 10.1128/aac.44.9.2530-2533.2000.
8. Yan, F., LaMarre, J. M., Rohrich, R., Wiesner, J., Jomaa, H., Mankin, A. S., and Fujimori, D. G. (2010) RlmN and Cfr are radical SAM enzymes involved in methylation of ribosomal RNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 3953-3964, doi: 10.1021/ja910850y.
9. Smith, L. K., and Mankin, A. S. (2008) Transcriptional and translational control of the *mir* operon, which confers resistance to seven classes of protein synthesis inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 1703-1712, doi: 10.1128/AAC.01583-07.
10. Fischer, N., Neumann, P., Konevega, A. L., Bock, L. V., Ficner, R., Rodnina, M. V., and Stark, H. (2015) Structure of the *E. coli* ribosome—EF—Tu complex at $< 3 \text{ \AA}$ resolution by Cs-corrected cryo-EM, *Nature*, **520**, 567-570, doi: 10.1038/nature14275.
11. Makarov, G., Golovin, A., Sumbatyan, N., and Bogdanov, A. (2015) Molecular dynamics investigation of a mechanism of allosteric signal transmission in ribosomes, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1047-1056, doi: 10.1134/S0006297915080106.
12. Vázquez-Laslop, N., Ramu, H., Klepacki, D., Kannan, K., and Mankin, A. S. (2010) The key function of a conserved and modified rRNA residue in the ribosomal response to the nascent peptide, *EMBO J.*, **29**, 3108-3117, doi: 10.1038/emboj.2010.180.
13. Sanbonmatsu, K. (2012) Computational studies of molecular machines: the ribosome, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **22**, 168-174, doi: 10.1016/j.sbi.2012.01.008.
14. Gnirke, A., Geigenmuller, U., Rheinberger, H. J., and Nierhaus, K. H. (1989) The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle. analysis with a heteropolymeric mRNA, *J. Biol. Chem.*, **264**, 7291-7301.
15. Chen, C., Stevens, B., Kaur, J., Smilansky, Z., Cooperma, B. S., and Goldman, Y. E. (2011) Allosteric vs. spontaneous exit-site (E-site) tRNA dissociation early in protein synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 16980-16985, doi: 10.1073/pnas.1106999108.
16. Cannone, J. J., Subramanian, S., Schnare, M. N., Collett, J. R., D'Souza, L. M., et al. (2002) The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs, *BMC Bioinform.*, **3**, 1-31, doi: 10.1186/1471-2105-3-2.
17. Makarova, T., and Bogdanov, A. (2019) Allosteric regulation of the ribosomal A site revealed by molecular dynamics simulations, *Biochimie*, **167**, 179-186, doi: 10.1016/j.biochi.2019.09.019.
18. Byrd, R., Lu, P., and Nocedal, J. (1995) A limited memory algorithm for bound constrained optimization, *SIAM J. Sci. Comput.*, **16**, 1190-1208.
19. Van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., and Berendsen, H. J. C. (2005) Gromacs: fast, flexible, free, *J. Comput. Chem.*, **26**, 1701-1718, doi: 10.1002/jcc.20291.
20. Hess, B., and Kutzner, C., van der Spoel, D., and Lindahl, E. (2008) Gromacs 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation, *J. Chem. Theory Comput.*, **4**, 435-447, doi: 10.1021/ct700301q.
21. Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., and Simmerling, C. (2015) ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB, *J. Chem. Theory Comput.*, **11**, 3696-3713, doi: 10.1021/acs.jctc.5b00255.
22. Лайков Д. Н., Устынюк Ю. А. (2005) Система квантово-химических программ «ПРИРОДА-04». Новые возможности исследования молекулярных систем с применением параллельных вычислений, *Известия Академии наук. Серия химическая*, **3**, 804-810.
23. Laikov, D. N. (2011) A new parametrizable model of molecular electronic structure, *J. Chem. Phys.*, **135**, 134120, doi: 10.1063/1.3646498.
24. Adamo, C., and Barone, V. (2002) Physically motivated density functionals with improved performances: the modified perdew—burke—ernzerhof model, *J. Chem. Phys.*, **116**, 5933-5940, doi: 10.1063/1.1458927.
25. Laikov, D. N. (2005) A new class of atomic basis functions for accurate electronic structure calculations of molecules, *Chem. Phys. Lett.*, **416**, 116-120, doi: 10.1016/j.cplett.2005.09.046.
26. Schmidt, M. W., Baldridge, K. K., Boatz, J. A., Elbert, S. T., Gordon, M. S., et al. (1993) General atomic and molecular electronic structure system, *J. Comput. Chem.*, **14**, 1347-1363, doi: 10.1002/jcc.540141112.
27. URL: <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>.
28. Bussi, G., Donadio, D., and Parrinello, M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling, *J. Chem. Phys.*, **126**, 014101, doi: 10.1063/1.2408420.
29. Berendsen, H., Postma, J., van Gunsteren, W., DiNola, A., and Haak, J. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.*, **81**, 3684-3690, doi: 10.1063/1.448118.
30. Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993) Particle mesh Ewald: an $n \log(n)$ method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.*, **98**, 10089, doi: 10.1063/1.464397.
31. Joung, I. S., and Cheatham, T. E. (2008) Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 9020-9041, doi: 10.1021/jp8001614.
32. Vázquez-Laslop, N., Ramu, H., and Mankin, A. (2011) Nascent peptide-mediated ribosome stalling promoted by antibiotics, in *Ribosomes: Structure, Function, and Dynamics*, (Rodnina, M. V., Wintermeyer, W., Green, R., eds), published by Springer-Verlag, Wien, pp. 377-392.

INVESTIGATION OF ALLOSTERIC EFFECT OF 2,8-DIMETHYLATION OF A2503 23S rRNA IN *E. coli* BY MOLECULAR-DYNAMICS SIMULATION**T. M. Makarova* and G. I. Makarov***South Ural State University, 454080 Chelyabinsk, Russia; E-mail: makarovatm@susu.ru*

Received June 16, 2020

Revised October 1, 2020

Accepted October 2, 2020

Ribosome is a molecular machine that synthesizes all cellular proteins. It also is a target of about half of the clinically used antibiotics. Adaptive chemical modification of ribosomal RNAs residues is one of the ways to provide resistance to certain antibiotics. A curious example of such modification is 2,8-dimethylation of A2503 in 23S rRNA, which induces resistance to phenols, linkosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and certain macrolides. In this article the effect of 2,8-dimethylation of A2503 on conformation and mobility of RNA residues of the 70S *E. coli* ribosome was investigated employing molecular dynamics simulations method. Significant alterations were detected both in the immediate environment of the 2503 23S rRNA residue and in the nucleotides located deeper in the nascent peptide exit tunnel (NPET), which are known to be involved in signal transmission from the antibiotics bound in the NPET to the peptidyl transferase center. These alterations shift the ribosome towards the A/A, P/P-state from the conformationally different state – P/P, E/E one in our case. The obtained results allow us to conclude that the effect of m²m⁸A2503 modification involves additional stabilization of the A/A, P/P-state favoring the peptidyl transferase reaction (PTR) contrary to antibiotics that inhibit PTR.

Keywords: ribosome, resistance, antibiotics, A2503, molecular dynamics