

ИССЛЕДОВАНИЕ РИБОСОМЫ МЕТОДАМИ МОДЕЛИРОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

©2016 г. Г. И. МАКАРОВ, Т. М. МАКАРОВА,
Н. В. СУМБАТЯН, А. А. БОГДАНОВ

*Научно-исследовательский институт физико-химической
биологии имени А.Н.Белозерского и Химический факультет
МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Моделирование рибосомы как молекулярной
машины. III. Физико-химическое изучение рибосомного туннеля.
IV. Моделирование взаимодействия антибиотиков с рибосомой.
V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Рибосома представляет собой молекулярную машину, которая синтезирует все клеточные белки в соответствии с программой, записанной в нуклеотидной последовательности информационной РНК. В последние годы в изучении структуры рибосомы достигнут впечатляющий прогресс. Благодаря совершенствованию методов исследования строения этих сложных РНК-белковых комплексов – рентгеноструктурного анализа и, в особенности, криоэлектронной микроскопии, стали доступными многочисленные атомные структуры не только бактериальных, но также митохондриальных и цитоплазматических рибосом эукариот (для ссылок см. [1–3]). Эти структуры детально описывают большинство функциональных состояний

Принятые сокращения: МД – молекулярная динамика, РТ – рибосомный туннель, ПТЦ – пептидилтрансферазный центр рибосомы, РСА – рентгеноструктурный анализ, КЭМ – криоэлектронная микроскопия, FRET – ферстеровский резонансный перенос энергии.

Адрес для корреспонденции: bogdanov@belozersky.msu.ru

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда: проекты 14-24-00061 (разделы, посвященные физико-химическому изучению рибосомного туннеля и моделированию взаимодействия антибиотиков с рибосомой) и 15-14-00006 (разделы, посвященные моделированию рибосомы как молекулярной машины).

комплексов рибосомы с лигандами (тРНК, мРНК, белковыми факторами, растущей полипептидной цепью, ингибиторами трансляции) на различных стадиях синтеза молекулы белка. Один из важнейших выводов, вытекающих из анализа накопленных структурных данных, состоит в том, что на каждом этапе синтеза полипептидной цепи белка рибосома приобретает специфическую конформацию. При этом предполагается, а в ряде случаев это было убедительно показано биохимическими и генетическими методами, что функциональные центры рибосомы в процессе ее работы обмениваются аллостерическими сигналами [4, 5], чем и достигается строгая координация отдельных стадий трансляции. Однако, механизм передачи таких сигналов, равно как и многие другие аспекты динамики работы рибосомы, остаются неизвестными. Более того, получить ответ на эти вопросы современными структурными методами практически невозможно или крайне затруднительно, поскольку они описывают отдельные фиксированные состояния функциональных комплексов рибосомы. Решить эту проблему исследователи пытаются с помощью расчетных методов и прежде всего с помощью моделирования (в англоязычной литературе «симуляции») молекулярной динамики (МД) рибосомы [6].

Моделирование МД позволяет наблюдать с атомным разрешением изменение конформации и относительного расположения мономерных звеньев белков и нуклеиновых кислот во времени, оценивать силу взаимодействий между этими звеньями, оценивать вероятность образования ими водородных связей, описывать их взаимодействие с молекулами воды, ионами и низкомолекулярными лигандами. В настоящем обзоре мы не планируем обсуждать физические основы и особенности разнообразных методов моделирования МД (читатель может найти их в [7, 8]). Здесь мы изложим новые сведения о рибосоме и ее функционировании, которые были (и, по-видимому, только и могли быть) получены этими методами.

Моделирование МД стало достаточно широко применяться в исследованиях такого крупного и сложно объекта, как рибосома, сравнительно недавно. Однако уже сейчас можно выделить три основных направления таких исследований: моделирование динамики работы рибосомы как молекулярной машины, изучение свойств рибосомного туннеля (РТ) и изучение молекулярных механизмов связывания лигандов рибосомы, прежде всего рибосомных антибиотиков.

II. МОДЕЛИРОВАНИЕ РИБОСОМЫ КАК МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАШИНЫ

Работы этого направления посвящены, в основном, моделированию распознавания рибосомой аминоксил-тРНК, моделированию динамики пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) и моделированию процесса транслокации.

МОДЕЛИРОВАНИЕ РАСПОЗНАВАНИЯ тРНК

Классическими работами лаборатории Рамакришнана установлено, что полностью консервативные остатки A1492 и A1493 малой субчастицы рибосомы (здесь и ниже используется нумерация нуклеотидных остатков рРНК, принятая для рибосом *E. coli*), выпетливаются из спирали h44 и, в случае образования «правильного» (т.е. полностью комплементарного) кодон-антикодового комплекса тРНК с мРНК, стабилизируют этот комплекс, встраиваясь в малую бороздку РНК-РНК спирали [9]. Таким образом, этот процесс носит отчетливо выраженный динамический характер. Поэтому не удивительно, что он привлек к себе внимание исследователей, применяющих моделирование МД. Энергетику этого процесса удалось достаточно детально оценить Зенгу и сотр. [10]. Используя метод зонтичной выборки и термодинамического интегрирования [11], они вычислили, что само по себе выпетливание этих остатков из спирали требует затрат свободной энергии в 7 ккал/моль. Связывание с мРНК «правильной» тРНК дает выигрыш свободной энергии в 9 ккал/моль, покрывая энергетические затраты на выпетливание и делая его самопроизвольным: энергетический эффект такого процесса – 2 ккал/моль. Связывание же «неправильной» тРНК дает выигрыш свободной энергии только в 6 ккал/моль и не покрывает затраты на выпетливание A1492 и A1493. Кроме того, в этой работе ещё раз, уже методами классической МД, был подтвержден механизм действия аминогликозидного антибиотика паромомицина, который стабилизирует выпетленное состояние A1492 и A1493 и делает связывание не только «правильной», но и «неправильной» тРНК энергетически выгодным. Правда, в последнем случае энергетический выигрыш всё же оказывается меньше.

Ответ на другой вопрос, а именно, как модификации в тРНК помогают ей отличать AUA-кодон (изолейцин) от AUG-кодона (метионин), был недавно получен Аквистом и сотр. [12]. Дело в том, что в бактериях и археях одна из тРНК^{Met} несет антикодон CAU, который должен был бы распознаваться метиониновым кодоном, если

бы не модификации остатка С34 в тРНК^{Ile} (третья позиция антикодона) лизидином у бактерий или агматидином у архей. Используя метод возмущения свободной энергии, авторы установили, что при замене кодона AUA на AUG в мРНК немодифицированный С34 обеспечивает прирост в свободной энергии связывания тРНК в 3 ккал/моль, тогда как С34, модифицированный агматидином, дает потерю свободной энергии связывания в 7 ккал/моль. При этом эта потеря почти одинакова как для амино-, так и для имино-формы модифицированного цитидина. Таким образом, связывание тРНК^{Ile} с модифицированным агматидином С34 в антикодоне CAU с метиониновым кодоном AUG на 10 ккал/моль энергетически менее выгодно, чем тРНК^{Met}, что и обеспечивает нужную селективность.

Те же авторы [13] рассмотрели вопрос о том, почему таутомеризация азотистых оснований из кето- в енольную форму не вызывает ошибок при декодировании мРНК и получили на него убедительный ответ. Методом возмущения свободной энергии (FER) в 51 окне авторы рассчитывали свободные энергии связывания тРНК^{Phe}, несущих правильные антикодоны, антикодоны с заменой А на Г в первом (тРНК^{Leu}) или втором (тРНК^{Ser}) положениях антикодона и антикодоны с заменой А на енольный таутомер G, с мРНК, несущей UUU-кодон, обычный или с енольным таутомером остатка уридилевой кислоты по первому или второму положениям (только для антикодонов с кето-формой гуанозина), которые сравнивали друг с другом. Выяснилось, что замена А на кето-форму G в первой позиции дает потерю в свободной энергии связывания Гиббса примерно на 5 ккал/моль, а замена на енольную форму G дает почти ту же потерю (6 ккал/моль при погрешности в 1 ккал/моль). Однако такая же замена во второй позиции для енольной формы гуанозина более выгодна, так как уменьшает потерю в энергии связывания (12,8 ккал/моль) на 4 ккал/моль. Переход остатка уридилевой кислоты в первой и, тем более, второй позиции кодона из кето- в енольную форму приводит к ещё большей потере в величине энергии связывания.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПЕПТИДИЛТРАНСФЕРАЗНОГО ЦЕНТРА

Работы, посвященные изучению конформационной подвижности и функциональной роли консервативных нуклеотидных остатков ПТЦ, как правило, представляют собой комплексные исследования, в которых моделирование МД сочетается с избирательной химической модификацией этих остатков или с их сайт-направленным мутагенезом. Так, Полачек и сотр. [14] при помощи экспериментов по трансляции *in vitro*, осуществляемой рибосомами с мономерными остатками 23S

рРНК в ПТЦ, либо вовсе лишенными азотистых оснований, либо содержащими азотистое основание, лишенное той или иной функциональной группы, установили, что разрушение неканонической пары A2450–C2063 приводит к подавлению синтеза полифенилаланина. Для объяснения этого факта ими было применено молекулярно-динамическое моделирование ПТЦ, в котором эта неканоническая пара разрушалась заменой аденина в A2450 на пурин или изъятием азотистых оснований из остатков A2450 или C2063. Анализ результатов моделирования показал, что разрушение неканонической пары A2450–C2063 любым способом приводило к радикальному снижению конформационной подвижности нуклеотидного остатка A2062, которая в нормальной рибосоме очень высока, и к нарушению его взаимодействий с аминокислотным остатком на 3'-конце А-тРНК, обусловленному тем, что остаток A2062 переходит в более или менее фиксированную конформацию, исключающую такое взаимодействие. С методической точки зрения работа служит примером моделирования лишь небольшой области рибосомы вместо моделирования целой рибосомы: моделировалась окрестность консервативных оснований радиусом в 3,2 нм, причем основания, лежащие за пределом 2 нм от центра моделируемой области, были фиксированы. Преимущество такого подхода заключается в экономии вычислительных ресурсов.

В работе Гонзалеса и сотр. [15] молекулярную динамику использовали для моделирования структуры элонгационного комплекса, содержащего Р-тРНК, ацилированную D-аминокислотой. Моделирование показало, что аминогруппа L-аминокислоты на А-тРНК оказывается дальше от сложноэфирной группы D-аминокислотного остатка на 3'-конце Р-тРНК, чем от таковой L-аминокислотного остатка; это обстоятельство затрудняет нуклеофильную атаку аминокислотной группой в ходе пептидилтрансферазной реакции, что и объясняет установленное в той же работе биохимическими методами радикальное затруднение трансляции с участием тРНК, несущих D-аминокислоту.

Удачным примером того, как рибосома может служить объектом для разработки методов изучения согласованного движения остатков в биополимерах является работа Панде и сотр. [16]. Авторы этого исследования взяли 70S рибосому *T. thermophilus*, несущую или не несущую тРНК и мРНК; согласованность движения остатков искали, вычисляя взаимную информацию для расстояния между наличным положением атома и скользящим средним его координат и кластеризуя координаты методом K-средних. При этом было выяснено, что нуклеотидные остатки 23S рРНК, формирующие А- и Р-сайты 50S субъединицы, движутся независимо друг от друга.

Кроме того, остатки А-сайта, платформы, с которой связывается 30S субъединица, и протуберанцев движутся независимо от остальной 50S субъединицы.

Ниже мы также опишем работы, в которых с помощью моделирования МД удалось достаточно детально проанализировать изменения в структуре ПТЦ, вызываемые различными антибиотиками (см. раздел IV).

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ТРАНСЛОКАЦИИ

В ходе транслокации происходит строго координированное перемещение по поверхности рибосомы крупных лигандов – мРНК и тРНК. Этот процесс чрезвычайно сложный. Он включает большое число промежуточных стадий, сопровождающихся образованием множества интермедиатов, охарактеризовать которые современными структурными методами удастся далеко не всегда. Поэтому моделирование этого этапа белкового синтеза методами МД представляет особый интерес. И здесь удалось получить несколько нетривиальных результатов.

Известно, что каждый из трех основных сайтов связывания тРНК с рибосомой (А, Р и Е) подразделяется на две части: одна из них находится на малой субъединице рибосомы, а другая – на большой (у бактериальных рибосом, на 30S и 50S субъединице, соответственно). Когда тРНК занимает один из этих сайтов полностью, это состояние обозначается как А/А, Р/Р или Е/Е, где первая буква относится к малой субъединице, а вторая – к большой. Однако перемещение тРНК из одного сайта в другой происходит через т.н. «гибридные» состояния, которые обозначают как А/Р и Р/Е. Кроме того, аминоксил-тРНК в комплексе с элонгационным фактором Tu и рибосомой находится в особой конформации, называемой А/Т-состоянием.

Санбонматсу, Шпаном и сотр. был разработан остроумный метод моделирования переходных состояний комплекса на примере «гибридных» комплексов рибосомы с тРНК [17]. Суть метода заключается в следующем. Авторы основывались на кристаллических структурах комплекса бактериальной рибосомы с двумя тРНК в Р/Р, А/А- и Е/Е, Р/Р-состояниях, содержащего также элонгационный фактор G (EF-G). Эти структуры соответствуют основному энергетическому минимуму изучаемой системы. С другой стороны, метод криоэлектронной микроскопии с анализом отдельных изображений позволил получить карты электронной плотности для аналогов переходного состояния комплекса рибосомы с EF-G с тРНК в А/Р*–Р/Е и А/Р–Р/Е-состояниях (в состоянии А/Р* ССА-конец тРНК еще не успел занять свое кано-

ническое положение). В эту карту была вписана трехмерная структура комплекса рибосомы с тРНК и EF-G. Далее была проведена минимизация энергии комплекса рибосомы с тРНК в P/P, A/A-состоянии и EF-G с гамильтонианом особого вида. В результате, при минимизации энергии комплекс «соскальзывает» к структуре, соответствующей переходному состоянию. Этим способом были получены структуры рибосомы с тРНК в гибридных A/P*-P/E и A/P-P/E-состояниях в присутствии фактора EF-G.

Переход деацелированной тРНК из P-сайта в E-сайт, точнее, из P/P в гибридное P/E-состояние, моделировался в работе [18]. Обобщая данные 120 траекторий, авторы установили, что образование гибридного состояния начинается с поворота малой субъединицы относительно большой на 5 градусов против часовой стрелки, что приводит к образованию растянутой конформации тРНК в P/P-состоянии. Запасенная в этой конформации энергия расходуется на следующих фазах перехода. Вслед за этим плечо тРНК продвигается к конфигурации, соответствующей гибриднему состоянию, не встречая стерических затруднений, и лишь затем 3'-ССА-конец тРНК покидает P-сайт большой субъединицы и входит в E-сайт, взаимодействуя с остатками спирали h74 23S рРНК по ходу перемещения. Стоит обратить внимание на использованные методы моделирования. Для моделирования перехода использовалась т.н. направленная динамика, являющаяся разновидностью управляемой динамики, в которой обобщенная координата отображает удаленность уже существующей конформации моделируемой системы от той, к которой нужно прийти, так что смещающий потенциал тянет систему к заданной конформации. Кроме того, расчет производился с использованием т.н. моделей, основанных на структуре, суть которых заключается в том [19], что, вместо учета нековалентных взаимодействий из начальных принципов, в потенциальной энергии учитываются т.н. контакты между атомами, существующие в экспериментально определенной структуре (в описываемой работе контакт учитывался в модели, если образующие его атомы находились ближе 4 Å в экспериментальной структуре и относились к не соседствующим остаткам). Силовые константы всех ковалентных взаимодействий также заданы не обычным для молекулярной динамики образом. Такая модель неявно предполагает, что экспериментально определенной структуре соответствует глобальный энергетический минимум для данных биополимеров, так что даже полностью развернутая цепь будет ускоренно двигаться к нему в процессе молекулярно-динамического моделирования. Авторы построили две таких модели: одну для A/A-P/P,

другую для P/P–E/E-комплекса и задали объединенную модель в виде их взвешенной суммы, так что система располагала двумя «глобальными» энергетическими минимумами, между которыми и совершался переход.

В более ранней работе Санбонматсу и соотр. изучалась кинетика процесса транслокации [20]. Для этого было предпринято рекордное по продолжительности (1,2 μs) моделирование 70S рибосомы *E. coli*, несущей две тРНК в A/A–P/P-состоянии. Исследователи определили три обобщенных координаты, описывающих процесс транслокации, именно: угол Θ_{body} , отображающий вращение малой субъединицы относительно большой, угол Θ_{head} , отображающий расхождение малой и большой субъединицы, и расстояние r_{tRNA} , представляющее собой расстояние между плечами обеих тРНК. Для изменения этих координат были оценены коэффициенты диффузии и частоты преодоления энергетических барьеров; последние составляют величину около $0,2 \mu\text{s}^{-1}$. Энергетические барьеры, разделяющие фазы транслокации, не превышают, по оценкам авторов, 9–12 ккал/моль.

Бок и др. смогли выявить потенциальную роль в процессе транслокации некоторых белков большой субъединицы рибосомы. Авторы моделировали 70S рибосому *E. coli*, исходя из 17 структур, полученных подгонкой рентгеноструктурных данных к электронным плотностям, полученным методом криоэлектронной микроскопии. По результатам моделирования оценивалась кинетика переходов между выбранными 17 фазами транслокации и наблюдались согласованные движения тРНК и функциональных элементов рибосомных субъединиц. В частности, авторы нашли, что L1-протуберанец проталкивает тРНК в E-сайт [21].

Моделирование открытой сравнительно недавно обратной транслокации дало богатую информацию об основных фазах процесса прямой транслокации [22]. Электронную плотность комплекса, состоящего из 70S рибосомы *T. thermophilus*, двух тРНК в P/P–E/E-состоянии (пост-состоянии), мРНК и элонгационного фактора G вписывали в электронную плотность комплекса такого же состава, но содержащего 70S рибосому *E. coli* и тРНК в A/A–P/P-состоянии и A/P*–P/E-состоянии. Параллельно вписыванию производился расчет свободной энергии вдоль реакционного пути методом зонтичной выборки. Расчеты показали, что претранслокационное состояние превосходит по свободной энергии посттранслокационное на 2–3 ккал/моль, а энергетический барьер, преодолеваемый при обратной транслокации, превосходит посттранслокационное состояние на 8 ккал/моль. Кроме того, наблюдалось вращение малой субъединицы относительно

большой по часовой стрелке (при прямой транслокации происходит вращение против часовой стрелки). Также наблюдалось открытие и закрытие т.н. «Р/Е-ворот», образованных остатками 16S рРНК G1338 и A1339 с одной стороны и остатком A790 с другой стороны. «Р/Е-ворота» широко «раскрывались» в претранслокационном состоянии, но были закрыты в промежуточном и посттранслокационном состояниях. Также наблюдались конформационные изменения в структуре элонгационного фактора G и изменения в его движении как целого.

В работе [23] изучалось взаимодействие малой и большой субъединицы в ходе транслокации. Для этого вписыванием модели рибосомы с тРНК и мРНК, основанной на рентгеноструктурных данных, в карты электронной плотности, полученные на основании данных криоэлектронной микроскопии, изготовили структуры тринадцати промежуточных состояний транслокации и из каждой запустили расчет молекулярной динамики протяженностью в 100 нс. По результатам анализа полученных траекторий авторы составили таблицу групп остатков 16S и 23S рРНК, образующих межсубъединичные контакты, и оценили энтальпию межсубъединичных контактов. Семь таких мостиков имели выраженно большие и устойчивые значения энтальпии. При этом при макроскопических движениях малой субъединицы относительно большой контакты перестраиваются за счет смены взаимодействующих остатков, а не локальных структурных перестроек. Также оценивался энтальпийный вклад тРНК и мРНК в удержании большой и малой субъединиц вместе; оказалось, что тРНК сильнее связаны с большой субъединицей, а мРНК, как известно, связана только с малой, так что взаимодействие тРНК с малой субъединицей и мРНК являются «узким местом» энтальпийного вклада тРНК в стабилизацию 70S рибосомы. Было также установлено, что 70S рибосома стабилизируется связыванием тРНК в Р-сайте больше, чем в А-или Е-сайтах.

III. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РИБОСОМНОГО ТУННЕЛЯ

Метод моделирования молекулярной динамики позволил получить ответы на несколько специфических вопросов, касающихся свойств рибосомного туннеля, что едва ли можно было сделать, используя существующие экспериментальные методы. Так, Панде и сотрудники [24] изучили свойства воды, заключенной в РТ. Была проведена симуляция молекулярной динамики для фрагмента большой субъединицы рибосомы, имеющего форму параллелепипеда и полностью

включающего в себя РТ, заполненный водой. По полученной траектории для воды были рассчитаны потенциал средней силы, вращательная энтропия, коэффициент диффузии и тензор флуктуации дипольного момента. Выяснилось, что коэффициент диффузии воды в туннеле понижен, равно как и понижена вращательная энтропия, что указывает на значительную упорядоченность молекул воды в РТ. На то же указывает и понижение значения следа тензора флуктуации дипольного момента по мере приближения к стенке туннеля. В целом, лишь на расстоянии порядка 0,5 нм от стенки свойства воды сколь-нибудь близки к свойствам воды в невозмущенном массиве.

В той же лаборатории было смоделировано взаимодействие боковых цепей аминокислот со стенками РТ [25]. Как и в описанной выше работе, обсчитывался лишь включающий в себя туннель параллелепипедальный фрагмент рибосомы. На внутренний объем туннеля была наложена трехмерная сетка с шагом в 0,1 нм, в узлах которой располагались зонды – молекулы, имитирующие боковые цепи аланина, изолейцина, лизина, аспарагиновой кислоты и триптофана. При этом полипептидный остов заменялся атомами водорода, чтобы исключить его вклад в энергию взаимодействия. Зонды закреплялись в узлах гармоническим потенциалом с высокой константой жесткости и располагались так, чтобы расстояние между ними превосходило радиус обрезания невалентных взаимодействий. По полученным траекториям рассчитывали карты потенциала средней силы. Выяснилось, что при выходе из туннеля имеется энергетический барьер высотой около 6 ккал/моль для остатков с крупными боковыми группами (изолейцин, лизин, триптофан) и около 1 ккал/моль для остатков с малыми (аланин, аспарагиновая кислота). Для выражено гидрофобных остатков (изолейцин, триптофан) потенциал средней силы распределен вдоль длинной оси туннеля более равномерно и имеет более высокие значения, так что их нахождение в туннеле энергетически невыгодно. Энергетический ландшафт для заряженных остатков (лизин, аспарагиновая кислота) имеет более сложную форму и зависит от заряда: там, где у лизина максимум, у аспарагиновой кислоты минимум. Кроме того, анализ траекторий показал наличие при выходе из туннеля своеобразных «ворот», образованных A497 23S рРНК и остатками аргинина белка L39, которые могут перекрывать нижнюю часть туннеля.

В работе [26] моделировалось прохождение растущей полипептидной цепи по туннелю. Моделью растущего пептида служила полиаланиновая цепь. Прохождение цепи моделировалось введением

специальной силы, которая тянет цепь к выходу. Анализ траекторий указал на прохождение полипептидной цепи под остатком Arg-92 белка L22, который совместно с белком L4 перекрывает значительную часть туннеля.

Нильсоном и сотр. была предпринята попытка смоделировать котрансляционное сворачивание домена «цинкового пальца» внутри рибосомного туннеля [27]. Известно, что в нижней части РТ могут сворачиваться альфа-спирали; но в обсуждаемой работе методами криоэлектронной микроскопии и молекулярной динамики независимо было показано, что в той же зоне рибосомного туннеля могут формироваться и элементы третичной структуры. Сворачивание пептидов, состоящих из участка стоп-пептида SecM и домена «цинкового пальца», разделенных аминокислотной цепью разной длины, моделировалось МД с обменом реплик при одновременном использовании т.н. «крупнозернистой» модели.

Одна из очевидных задач моделирования молекулярной динамики рибосомы состоит в поиске подходов к выяснению механизма передачи аллостерических сигналов в РТ. Авторами настоящего обзора было предпринято молекулярно-динамическое моделирование центрального фрагмента большой субъединицы рибосомы *E. coli*, включающего весь ПТЦ и РТ [28]. Выбор этого фрагмента был обусловлен тем хорошо установленным фактом, что нуклеотидный остаток A2062, занимающий в нем центральное положение, участвует в передаче аллостерического сигнала в ПТЦ из удаленных от него областей РТ, а мутации A2062 её обрывают [29]. Для этой системы были получены траектории продолжительностью от 200 нс до 360 нс. При их анализе были обнаружены конформационные переходы, в которых наряду с остатками, принадлежащими участку 2058–2063 23S рРНК, были задействованы и некоторые н.о. ПТЦ. Эти переходы показаны на рис. 1. Иногда они происходили поодиночке, иногда совместно, причем в ряде траекторий они соединяются в единый конформационный переход. Он начинается с того, что на 60 нс основания A2058 и A2059 сходятся. В конечном итоге блок оснований A2058–A2059–m²A2503–G2061, существовавший до конформационного перехода, и вновь образовавшийся блок оснований A2062–C2063–U2585 соединяются в единую стопкообразную структуру. Этот переход оказался обратимым. Расчеты величин энергий кулоновских и вандер-ваальсовых взаимодействий между соседними нуклеотидными остатками показали, что в ходе конформационных перестроек между 80 и 160 нс система преодолевает энергетический барьер, отвечающий

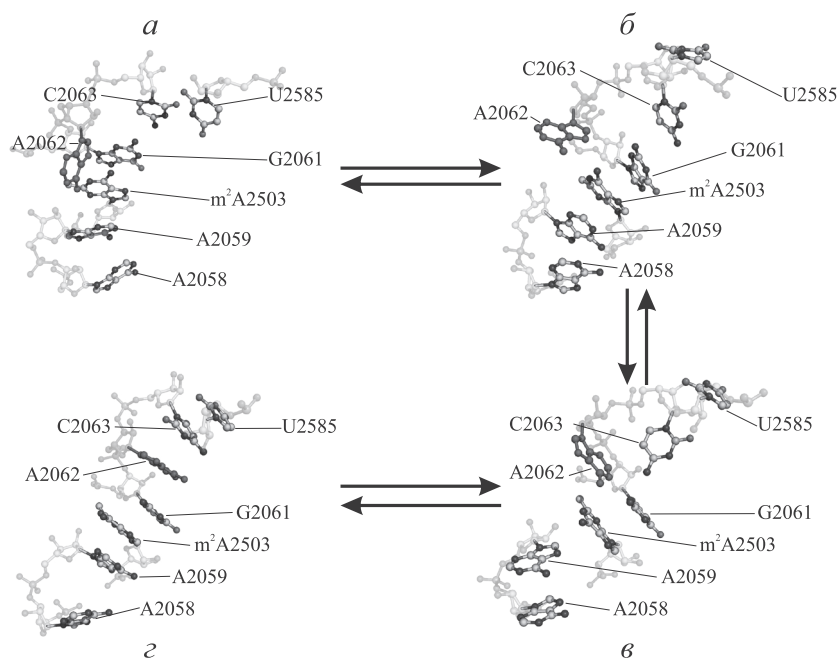


Рис. 1. Основные фазы конформационного перехода в участке A2058–C2063 23S рРНК рибосомы *E. coli*, наблюдаемого посредством моделирования молекулярной динамики: а — начальная (4 нс); б и в — промежуточные (71 и 117 нс, соответственно) и г — конечная (353 нс) стадии.

конформациям, в которых основания G2061 и C2063 уже разошлись, но A2062 и U2585 ещё не образовали с ними контакты, стабилизированные стэкинг-взаимодействиями.

Относительно функционального смысла наблюдаемого конформационного перехода была высказана гипотеза, что его конечное состояние может закрепляться тем или иным регуляторным лигандом рибосомы, что приведет к остановке трансляции [28].

IV. МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ С РИБОСОМОЙ

Особое направление исследований рибосомы методом моделирования МД представляет собой изучение связывания рибосомой антибиотиков. Характерным примером здесь может служить работа Александрова и Симонсона, в которой изучалось связывание тетрациклина с малой субъединицей рибосомы [30]. По данным рентгеноструктурного анализа тетрациклин имеет, по крайней мере, два сайта связывания на малой субъединице: TET1 и TET5. Было проведено моделирование молекулярной динамики для сферических фрагментов малой субъединицы радиусом в 2,6 нм, в чьих центрах располагались сайты связывания тетрациклина. Авторам удалось рассчитать разницу между свободными энергиями Гиббса связывания тетрациклина по каждому сайту. Используя эту величину и экспериментальную константу ассоциации комплекса тетрациклин-рибосома, авторы рассчитали занятости обоих сайтов, оказавшиеся равными $\approx 100\%$ для TET1 и $\approx 57\%$ для TET5. Таким образом, был выявлен сайт, имеющий наибольшее сродство к тетрациклину.

Ранее предполагалось, что антибиотик гентамицин, связываясь с малой субъединицей в районе А-сайта, закрепляет основания A1492 и A1493 в выпетленном состоянии, что приводит к выборке не соответствующих кодону aa-тРНК и синтезу белков с множественными ошибками. Однако, моделирование, проведенное Вайаной и Санбонматсу [31], показало, что конформационную перестройку инициирует отнюдь не собственно связывание антибиотика в этом сайте. Напротив, сами основания A1492 и A1493 случайным образом то выпетливаются, то входят обратно в дуплекс, а гентамицин, способный менее специфически связываться рядом со своим основным сайтом, постепенно вклинивается в него, сначала занимая место одного из оснований в дуплексе и фиксируя его в выпетленном состоянии, а затем фиксируя другое. Особо стоит отметить, что в этой работе использовался метод МД с обменом реплик.

Аминогликозидам посвящена также работа Трыльски и сотр., изучавших молекулярные механизмы устойчивости к паромомицину [32]. Работа интересна тем, что в ней моделируется взаимодействие антибиотика не с целой малой субъединицей, а с фрагментом молекулы 16S рРНК, воспроизводящим ту спираль h44, с которой и связывается паромомицин в целой рибосоме. В модельную РНК вносились мутации G1491A, G1491U, U1495C и U1406C. Моделирование молекулярной динамики в присутствии и в отсутствие паромомицина

позволило отчетливо наблюдать, каким образом изменение движения оснований A1492 и A1493 вызывает дестабилизацию спаривания оснований и ухудшение связывания антибиотика.

Связывание аминогликозидного антибиотика паромомицина с малой субъединицей бактериальной рибосомы и влияние на это связывание мутаций K42A и R53A в белке S12, опосредуемых изменением конформации остатков A1492 и A1493 А-сайта изучалось также в работе [33]. Известно, что эти мутации приводят к преувеличенно точному распознаванию аминоацил-тРНК в А-сайте 30S субъединицы, подавляя при этом действие аминогликозидных антибиотиков, которое, напротив, состоит в понижении избирательности рибосомы к аминоацил-тРНК. На основании анализа конформаций остатков A1492 и A1493 авторы предположили, что меньшая частота их выпетливания приводит к меньшему средству малой субъединицы к приходящей аминоацил-тРНК, что делает её прочное взаимодействие с информационной РНК более значимой. Авторы высказали предположение, что причина этих изменений в динамике конформаций A1492 и A1493 кроется в перестройке сети водородных связей между 16S рРНК и белком S12, вызываемой заменой лизина или аргинина, чьи боковые цепи являются донорами водородных связей, на аланин, чья боковая цепь этим свойством не обладает.

В ряде работ осуществлялось моделирование МД комплексов антибиотиков с большой субъединицей бактериальной рибосомы. Так, например, Вольф и др. изучили действие антибиотика тиострептона на связанную с ГТФазой область большой субъединицы рибосомы, включающую белок L11 и спирали 43 и 44 23S рРНК методами молекулярной динамики и кругового дихроизма [34]. Анализируя полученные траектории методами анализа основных компонент, кластеризации в пространстве главных компонент и корреляционного анализа, авторам удалось установить, что тиострептон подавляет внутреннюю подвижность доменов белка, делая его более жестким, и меняет конформацию остатка A1067, стабилизируя его анти-конформацию. Остаток A1067 же важен для узнавания тРНК и факторов элонгации. Недостатком работы можно считать то, что моделируемая система включала в себя исключительно белок L11 и спирали 43 и 44 (остатки с 1051 по 1108), причем без каких-либо ограничений. Эта особенность построения моделируемой системы, с одной стороны, оставляет сомнения в воспроизведении пространственной структуры 23S рРНК при расчете, с другой стороны, не позволяет быть полностью уверенным в поддержании правильной структуры комплекса 23S рРНК с белком L11 и, наконец, приводит к понижению скорости расчета.

В то же время известно, что основными мишенями для связывания большинства антибиотиков служат ПТЦ рибосомы и РТ. Так, в работе [35] рассчитывали свободную энергию Гиббса связывания спарсомицина с большой субъединицей рибосомы методом возмущения свободной энергии. При этом в расчете участвовала не целая рибосома, а её фрагмент — сфера радиусом 1,5 нм, в центре которой находится Р-сайт большой субъединицы, с которым и связывается спарсомицин. Тем не менее, полученное значение хорошо согласовывалось с экспериментальными данными.

На первый взгляд, более детальные данные были получены Ямом и Вахабом [36], которые исследовали связывание эритромицина и рокситромицина с рибосомой. Однако, полученные авторами величины энергии связывания довольно сильно отличаются от экспериментальных. Причина этого, по-видимому, заключается в том, что в цитированной работе рассчитывались только 2,5 нс траектории, из которых, судя по графикам среднеквадратичного отклонения, на уравнившуюся систему приходится всего 0,5 нс. К тому же, избранный метод расчета явным образом учитывает свойства растворителя, а между тем, судя по работе [24], его свойства сильно отличаются от свойств «в массиве». Вывод о преимущественном вкладе гидрофобных взаимодействий спорен по той же причине: непонятно, как меняется энтропия воды в рибосомном туннеле при связывании антибиотика.

Те же сложности возникают при анализе данных, полученных в работе Сайни и др., которые моделировали связывание антибиотиков линезолида и радезолида, относящихся к семейству оксазолидинонов, с рибосомами *Haloarcula marismortui* и *Deinococcus radiodurans* [37]. Иными словами, цитируемые выше работы показывают, что область молекулярно-динамического моделирования взаимодействия антибиотиков с рибосомой находится еще в начальной стадии своего развития.

В то же время интересных результатов можно было бы ожидать от применения молекулярно-динамического моделирования при описании воздействия антибиотиков макролидов на функционирование ПТЦ с целью выяснения механизма остановки трансляции регуляторными стоп-пептидами семейства Erm. Ранее здесь были получены убедительные данные, демонстрирующие аллостерический характер воздействия макролидов на ПТЦ [38]. И, действительно, при моделировании МД комплексов рибосомы с эритромицином, который с ПТЦ прямо не контактирует, наблюдали изменение конформаций высокоподвижных ключевых остатков A2602 и U2585 этого центра:

эти остатки тяготеют к образованию стопок с соседствующими в цепи нуклеотидными остатками, вместо того, чтобы смещаться в просвет РТ [38]. Однако никаких предположений относительно конкретного механизма передачи сигнала из сайта связывания макролидов в ПТЦ на этом этапе исследований высказано не было.

Впечатляющий прогресс здесь был достигнут только в самое последнее время. Недавно Манькин и соотр. применили молекулярно-динамическое моделирование комплекса рибосомы с макролидом эритромицином или кетолидом телитромицином в присутствии взаимодействующего с РТ регуляторного стоп-пептида ErmBL [39]. Целью авторов было попытаться найти структурное объяснение наблюдаемой ими в биохимических и микробиологических экспериментах зависимости специфичности ErmBL по отношению к этим антибиотикам от его аминокислотной последовательности. Так, пептид ErmBL с остатком аспарагиновой кислоты в десятом положении (Asp10, природный пептид) вызывает остановку трансляции в присутствии как эритромицина, так и телитромицина, тогда как ErmBL с остатком глутаминовой кислотой в том же положении (Glu10) останавливает трансляцию в присутствии лишь эритромицина. Заметим, что и в том, и в другом случае Glu10 находится на С-конце пептида, связанным с 3'-концевым остатком тРНК в Р-сайте, а остановка трансляции происходит потому, что он не может прореагировать с остатком лизина (Lys11), ацилирующим 3'-конец (A76) т-РНК в А-сайте. Моделирование показало, что и для эритромицина, и для телитромицина в присутствии природного пептида понижается частота, с которой Lys11 оказывается ориентирован относительно сложноэфирной группы пептида в Р-сайте выгодным для нуклеофильной атаки (и образования новой пептидной связи) образом. При замене Asp10 на Glu10 такая ориентация с достаточной высокой частотой наблюдается для эритромицина, но не для телитромицина; если же Asp10 заменить на тирозин, то выгодные взаимные ориентации субстратов пептидилтрансферазной реакции достигаются реже для телитромицина, чем для эритромицина. Авторы объясняют это тем, что γ -карбоксильная группа остатка Glu10 образует водородную связь с 4'-гидроксильной группой кладинозы эритромицина, что и сдвигает распределение ориентаций в сторону невыгодных для пептидилтрансферазной реакции в случае Glu10-мутанта. Такое взаимодействие невозможно в случае телитромицина, у которого отсутствует кладинозный остаток, и в случае эритромицина и природного ErmBL, когда остаток Asp10 удален от остатка кладинозы на достаточно большое расстояние. Таким образом, моле-

кулярно-динамическое моделирование позволило авторам, по сути дела, найти рациональное объяснение обнаруженному ими фундаментальному явлению - способности рибосомы селективно реагировать на различные малые молекулы, связывающиеся в районе ее функциональных центров.

Важным продолжением и развитием этих исследований служит работа Аренца и др., которые провели молекулярно-динамическое моделирование, по сути дела, одной из тех же систем, но основываясь на гораздо более детальной структуре регуляторного пептида EgmBL в РТ, полученной с помощью высокоразрешающей крио-электронной микроскопии [40]. В распоряжении авторов были подробные данные о расположении боковых групп аминокислотных остатков в EgmBL относительно стенок РТ вблизи ПТЦ в отсутствие и присутствии эритромицина в системе. При этом наблюдалось несколько интересных явлений. Если в системе без антибиотика пептид располагался достаточно свободно в РТ, то в присутствии эритромицина он оказывался как бы прижатым к его стенке, примыкающей к Р-сайту ПТЦ; важно, что при этом антибиотик с пептидом не контактировал. Кроме того, на противоположной стенке РТ нуклеотидные остатки 23S рРНК G2505-U2506/C2452 изменяли свое положение относительно оси РТ, удаляясь от нее. Это приводило к тому, что Lys11, взаимодействующий с этим сегментом 23S рРНК, смещался в том же направлении. Более того, наблюдалось изменение положения остатка A76 тРНК в Р-сайте и конформации ацилирующего его Asp10. Все эти изменения происходили за счет аллостерических эффектов и полностью исключали возможность продуктивной пептидилтрансферазной реакции. В то же время, с нашей точки зрения, авторы слишком упрощенно интерпретируют взаимодействие аминокислотного остатка аминоацил-тРНК в А-сайте со стенками РТ, относя их только к электростатическим. Действительно, замены Lys11 на остатки триптофана, изолейцина и даже глицина, лишенные дополнительного положительного заряда, а также отрицательно заряженный остаток глутаминовой кислоты вызывали арест трансляции на том же уровне, что лизин (см. рис. 7g в [41]). Заметим также, что проведенное в этой работе моделирование молекулярной динамики позволило получить обширную информацию о положении и стабильности водородных связей, которые аминокислотные остатки EgmBL образуют с нуклеотидными остатками на стенках РТ.

В заключение этого раздела отметим еще одно важное формирующееся сейчас направление в моделировании молекулярной динамики комплексов антибиотиков с рибосомой. Оно заключается в глубоком

анализе причин появления у рибосом устойчивости к антибиотикам. Примером здесь может служить работа Смола и др., в которой изучалось влияние N6-метилирования остатка A2058 23S рРНК, а также его мутации A2058G на связывание кетолида телитромицина [41]. Известно, что N6-метилирование A2058 или его замена на гуанин приводят к устойчивости рибосомы к макролидам. В то же время телитромицин частично преодолевает влияние мутации A2058G, но не метилирования. Проведенное исследование показывает, что мутация A2058G сохраняет возможность для 2'-гидроксильной группы телитромицина участвовать в образовании водородной связи с рибосомой, делая, однако, её не донором, а акцептором протона N1H гуанина. Водородная связь этой группы с N1 A2058 сохраняется и при диметилировании последнего. Монометилирование же A2058 подавляет эту водородную связь, по-видимому, из-за нарушения его стэкинг-взаимодействий с соседними остатками. Кроме того, при мутации A2058G сохраняется стэкинг-взаимодействие имидазол-пиридинового фрагмента телитромицина с уотсон-криковской парой A752-U2609, а при метилировании A2058 оно дестабилизируется. Объясняется это тем, что метилирование A2058, как указывалось выше, возмущает его стэкинг-взаимодействие с соседними остатками G2057 и A2059. Это возмущение передается с G2057 на остаток C2611 через уотсон-криковскую пару, с последнего через ковалентные связи на U2609. Вследствие этого ослабляются его водородные связи с A752 и нарушается взаимодействие с телитромицином. Это и снижает устойчивость комплекса телитромицина с рибосомой, несущей метилированный A2058. Стоит отметить остроумный подход, использованный при моделировании: расчет молекулярной динамики для выделенного участка обводнённой рибосомы (10000 шагов) перемежался с расстановкой молекул воды методом Монте-Карло с большим каноническим ансамблем (10000 шагов), что позволяло стабилизировать более удачной сольватацией новые конформации, оптимизируемые молекулярной динамикой. Этот приём улучшал представительность получаемой при моделировании выборки состояний системы.

Известно, что мутация G2482A рибосомы *H. marismortui* (G2447A *E. coli*) вызывает устойчивость бактериальных рибосом к антибиотикам, например, к хлорамфениколу или тиамулину, связывающимся в «гидрофобном кармане» ПТЦ, образуемом остатками A2486 и C2487 (A2451 и C2452 *E. coli*). При этом остаток G2482 не контактирует с такими антибиотиками непосредственно. Моделируя методом МД рибосому *H. marismortui*, содержащую и не содержа-

щую мутацию G2482A, и анализируя полученные траектории методами анализа основных компонент и кросс-корреляционного анализа, исследователи пришли к выводу о том, что возникновение устойчивости к антибиотикам связано с увеличением подвижности остатков A2486 и C2487 (A2451 и C2452 *E. coli*), которое вызвано возмущением сети нековалентных взаимодействий, удерживающих пространственную структуру 23S рРНК [42].

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ работ, в которых методы молекулярной динамики применялись для моделирования тех или иных аспектов функционирования рибосомы, показывает, что молекулярно-динамическое моделирование успешно и плодотворно применяется для исследования рибосомы. Молекулярная динамика позволяет моделировать структуры состояний рибосомы, едва ли обнаружимых экспериментально, и оценивать их энергетические характеристики, исследовать физико-химические характеристики стенок рибосомного туннеля или упорядоченность воды в нем, и, самое важное, моделировать сложные согласованные движения и конформационные перестройки в структуре рибосомы, происходящие при её функционировании или возбуждаемые связыванием антибиотиков. Такие структурные методы, как рентгеноструктурный анализ или, в меньшей степени, криоэлектронная микроскопия, отображают статичные, замершие структуры тех или иных состояний рибосомы, по которым не всегда возможно восстановить детальный, на атомном уровне, механизм происходящих в рибосоме процессов и динамические свойства интересующих нас участков структуры рибосомы. Кроме того, эти структурные методы отображают свойства ансамблей рибосом, к тому же, находящихся не вполне в естественной среде раствора (особенно это касается рентгеноструктурного анализа). Молекулярная динамика же позволяет смоделировать (естественно, опираясь на доступные структурные и иные экспериментальные данные) именно развитие протекающих в рибосоме процессов во времени и в среде водного раствора нужных ионов. Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что такое моделирование вполне достоверно и отображает наблюдаемые на макроскопическом уровне явления. Таким образом, применение методов молекулярной динамики к моделированию структуры и функционирования рибосомы и её комплексов со всевозможными лигандами оправданно и результативно, хотя и может потребовать больших затрат процессорного времени из-за крупного размера моделируемого объекта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M. (2012) One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 560–567.
2. Amunts, A., Brown, A., Toots, J., Scheres, S.H.W., Ramakrishnan, V. (2015) The structure of human mitochondrial ribosome. *Science*, **348**, 95–98.
3. Frank, J. (2016) Whither ribosome structure and dynamics research? (A perspective). *J. Mol. Biol.* doi: 10.1016/j.jmb.2016.04.034.
4. Wang, L., Pulk, A., Wasserman, M.R., Feldman, M.B., Altman, R.B., Doudna, C.J.H., Blanchard, S.C. (2012) Allosteric control of the ribosome by small-molecule antibiotics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 957–963.
5. Fei, J., Bronson, J.E., Hofman, J.M., Srinivas, R.L., Wiggins, C.H., Gonzalez, R.L.Jr. (2009) Allosteric collaboration between elongation factor G and the ribosomal L1 stalk directs tRNA movements during translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 15702–15707.
6. Sonbonmatsu, K.Y. (2012) Computational studies of molecular machines: ribosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **22**, 168–174.
7. Perilla, J.R., Goh, B.C., Cassidy, C.K., Liu, B., Bernardi, R.C., Rudack, T., Yu, H., Wu, Z., Schulten, K. (2015) Molecular dynamics simulations of large macromolecular complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **31**, 64–74.
8. Hospital, A., Coni, J.R., Orzco, M., Gelp, J.L. (2015) Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Adv. Appl. Bioinform. Chem.*, **8**, 37–47.
9. Carter, A.P., Clemons, W.M.J., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R., Wimberly, B.T., Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interaction with antibiotics. *Nature*, **407**, 340–348.
10. Zeng, X., Chugh, J., Casiano-Negroni, A., Al-Hashimi, H.M., Brooks, C.L. 3rd. (2014) Flipping of the ribosomal A-site adenines provides a basis for tRNA selection. *J. Mol. Biol.*, **426**, 3201–3213.
11. Knight, J.L., Brooks, C.L. (2009) λ -Dynamics free energy simulation methods. *J. Comput. Chem.*, **30**, 1692–1700.
12. Satpati, P., Bauer, P., Åqvist, J. (2014) Energetic tuning by tRNA modifications ensures correct decoding of isoleucine and methionine on the ribosome. *Chemistry*, **20**, 10271–10275.
13. Satpati, P., Åqvist, J. (2014) Why base tautomerization does not cause errors in mRNA decoding on the ribosome. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 12876–12884.
14. Chirkova, A., Erlacher, M., Clementi, N., Zywicki, M., Aigner, M., Polacek, N. (2010) The role of the universally conserved A2450–C2063 base pair in the ribosomal peptidyl transferase center. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 4844–4855.
15. Englander, M.T., Avins, J.L., Fleisher, R.C., Liu, B., Effraim, P.R., Wang, J., Schulten, K., Leyh, T.S., Gonzalez, R.L., Cornish, V.W. (2015) The ribosome can discriminate the chirality of amino acids within its peptidyl-transferase center. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 6038–6043.
16. Brandman, R., Brandman, Y., Pande, V.S. (2012) A-site residues move independently from p-site residues in all-atom molecular dynamics simulations of the 70S bacterial ribosome. *PLoS ONE*, **7**, e29377.
17. Whitford, P.C., Ahmed, A.Yu.Y., Hennely, S.P., Tama, F., Spahn, C.M., Onuchic J.N., Sanbonmatsu, K.Y. (2011) Excited states of ribosome

- translocation revealed through integrative molecular modeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 18943–8948.
18. Whitford, P.C., Sanbonmatsu, K.Y. (2013) Simulating movement of tRNA through the ribosome during hybrid-state formation. *J. Chem. Phys.*, **139**, 121919.
 19. Noel, J.K., Whitford, P.C., Sanbonmatsu, K.Y., Onuchic, J.N. (2010) SMOG@ctbp: simplified deployment of structure-based models in GROMACS. *Nucleic Acids Res.*, **38**, W657–W661.
 20. Whitford, P.C., Blanchard, S.C., Cate, J.H.D., Sanbonmatsu, K.Y. (2013) Connecting the kinetics and energy landscape of tRNA translocation on the ribosome. *PLoS Comput Biol.*, **9**, e1003003.
 21. Bock, L.V., Blau, C., Schroder, G.F., Davydov, I.I., Fischer, N., Stark, H., Rodnina, V., Vaiana, A.C., Grubmuller, H. (2013) Energy barriers and driving forces in tRNA translocation through the ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 1390–1396.
 22. Ishida, H., Matsumoto, A. (2014) Free-energy landscape of reverse tRNA: translocation through the ribosome analyzed by electron microscopy density maps and molecular dynamics simulations. *PLoS ONE*, **9**, e101951.
 23. Bock, L.V., Blau, C., Vaiana, A.C., Grubmuller, H. (2015) Dynamic contact network between ribosomal subunits enables rapid large-scale rotation during spontaneous translocation. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 6747–6760.
 24. Lucent, D., Snow, C., Aitken, C., Pande, V. (2010) Non-bulk-like solvent behavior in the ribosome exit tunnel. *PLoS Comput. Biol.*, **6**, e1000963.
 25. Petrone, P., Snow, C., Lucent, D., Pande, V. (2008) Side-chain recognition and gating in the ribosome exit tunnel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16549–16554.
 26. Ishida, H., Hayward, S. (2008) Path of nascent polypeptide in exit tunnel revealed by molecular dynamics simulation of ribosome. *Biophys. J.*, **95**, 5962–5973.
 27. Nilsson, O.B., Hedman, R., Marino, J., Wickles, S., Bischoff, L., Johansson, M., Muller-Lucks, A., Trovato, F., Puglisi, J.D., O'Brien, E.P., Beckmann R, von Heijne G. (2015) Co-translational protein folding inside the ribosome exit tunnel. *Cell Rep.*, **12**, 1533–1540.
 28. Макаров, Г.И., Головин, А.В., Сумбатьян, Н.В., Богданов, А.А. (2015) Изучение передачи аллостерических сигналов в рибосоме методом молекулярной динамики. *Биохимия*, **80**, 1250–1251.
 29. Vázquez-Laslop, N., Ramu, H., Klepacki, D., Kannan, K., 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.
 30. Alexandrov, A., Simonson, T. (2008) Molecular dynamics simulations of the 30S ribosomal subunit reveal a preferred tetracycline binding site. *J. Amer. Chem. Soc.*, **130**, 1114–1115.
 31. Vaiana, A., Sanbonmatsu, K. (2009) Stochastic gating and drug-ribosome interactions. *J. Mol. Biol.*, **386**, 648–661.
 32. Romanowska, J., McCammon, J., Trylska, J. (2011) Understanding the origins of bacterial resistance to aminoglycosides through molecular dynamics mutational study of the ribosomal A-site. *PLoS Comput. Biol.*, **7**, e1002099.
 33. Panecka, J., Mura, C., Trylska, J. (2014) Interplay of the bacterial ribosomal a-site, s12 protein mutations and paromomycin binding: a mole-

- cular dynamics study. *PLoS One*, **9**, e111811.
34. Wolf, A., Baumann, S., Arndt, H.D., Kirschner, K.N. (2012) Influence of thiostrepton binding on the ribosomal GTPase associated region characterized by molecular dynamics simulation. *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 7194–7205.
35. Ge, X., Roux, B. (2010) Calculation of the standard binding free energy of sparsomycin to the ribosomal peptidyl-transferase P-site using molecular dynamics simulations with restraining potentials. *J. Mol. Recogn.*, **23**, 128–141.
36. Yam, W.K., Wahab, H.A. (2009) Molecular insights into 14-membered macrolides using the MM-PBSA method. *J. Chem. Inf. Model.*, **49**, 1558–1567.
37. Saini, J., Homeyer, N., Fulle, S., Gohlke, H. (2013) Determinants of the species selectivity of oxazolidinone antibiotics targeting the large ribosomal subunit. *Biol. Chem.*, **394**, 1529–1541.
38. Sothiselvam, S., Liu, B., Han, W., Ramu, H., Klepacki, D., Atkinson, G.C., Brauer, A., Remm, M., Tenson, T., Schulten, K., Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S. (2014) Macrolide antibiotics allosterically predispose the ribosome for translation arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 9804–9809.
39. Gupta, P., Liu, B., Klepacki, D., Gupta, V., Schulten, K., Mankin, A.S., Vázquez-Laslop, N. (2016) Nascent peptide assists the ribosome in recognizing chemically distinct small molecules. *Nat. Chem. Biol.*, **12**, 153–158.
40. Arenz, S., Bock, L.V., Graf, M., Innis, C.A., Beckmann, R., Grubmüller, H., Vaiana, A.C, Wilson, D.N. (2016) A combined cryo-EM and molecular dynamics approach reveals the mechanism of ErmBL-mediated translation arrest. *Nat. Commun.*, **7**, 12026.
41. Small, M.C., Lopes, P., Andrade, R.B., MacKerell Jr., A.D. (2013) Impact of ribosomal modification on the binding of the antibiotic teli-thromycin using a combined grand canonical monte carlo/molecular dynamics simulation approach. *PLoS Comput. Biol.*, **9**, e1003113.
42. Wang, Y., Shen, J.K., Schroeder, S.J. (2012) Nucleotide dynamics at the A-site cleft in the peptidyltransferase center of *H. marismortui* 50S ribosomal subunits. *J. Phys. Chem. Lett.*, **8**, 1007–1010.