

УДК 577.113

Д.А. Бешнова, аспирант*Севастопольский национальный технический университет**ул. Университетская 33, г. Севастополь, Украина, 99053**E-mail: dasha_beshnova@mail.ru***ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ
АМИНОГЛИКОЗИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ С РНК**

В настоящей работе проведен расчет вкладов основных физических факторов в полную энергию комплексообразования аминогликозидных антибиотиков с 27-мером РНК. Показано, что электростатические, ван-дер-Ваальсовы и гидрофобные взаимодействия способствуют комплексообразованию антибиотиков с РНК. Водородные связи, конформационные и энтропийные составляющие являются энергетически невыгодными.

Ключевые слова: комплексообразование, аминогликозидные антибиотики.

Введение

Аминогликозидные антибиотики представляют собой группу препаратов, нашедших широкое применение при лечении инфекций, вызываемых аэробными грамотрицательными бактериями [1]. Антибактериальная активность антибиотиков данной серии проявляется путем связывания с рибосомной РНК с последующим ингибированием синтеза белков. Основной мишенью аминогликозидных антибиотиков является последовательность, образующая так называемый А сайт, в 16S рРНК малой (30S) субъединицы рибосомы прокариот [2]. Для изучения связывания аминогликозидных антибиотиков с декодирующим А сайтом РНК была синтезирована 27-мерная олигонуклеотидная шпильчатая структура, имеющая такой же олигонуклеотидный состав, как и в 30S субъединице рибосомы [3].

Для определения биологической активности аминогликозидных антибиотиков и для реализации стратегии направленного синтеза новых лекарственных препаратов необходима детальная информация о механизме комплексообразования антибиотиков с РНК. Это, в свою очередь, требует знания вклада основных типов взаимодействий, стабилизирующих комплексы. Ранее методика расчета различных физических факторов, участвующих в образовании комплекса, была подробно описана для процессов само-, гетероассоциации низкомолекулярных соединений и их комплексообразования с молекулой ДНК [4]. Однако для системы аминогликозидный антибиотик-РНК подобный анализ ранее не проводился. По-видимому, наибольшим приближением к проблеме расчета энергетических вкладов в системах Лиганд-РНК является серия работ [5]. Однако результаты этих исследований дают возможность выделить из структуры термодинамических потенциалов лишь гидрофобный и полиэлектролитный вклады, и не предоставляют способа расчета энергетического вклада таких ключевых физических факторов как ван-дер-Ваальсовы, электростатические взаимодействия, водородные связи и др.

Целью настоящей работы является расчет вкладов различных физических факторов в суммарную энергию комплексообразования двух наиболее распространенных аминогликозидных антибиотиков: неомицина (Neo) и паромомицина (Par) со шпильчатой структурой 27-мера А сайта РНК (A-site model RNA) [5].

Материалы и методы*Структуры антибиотиков и РНК.*

Пространственные структуры антибиотиков Neo, Par (рисунок 1) и 27-мера РНК (рисунок 2) взяты из Protein Data Bank (PDB коды 2et4, 1j7t, и 1a3m соответственно). Атомные заряды Neo и Par взяты из статьи [5]. Топология всех молекул лигандов и параметризация всех валентных и ван-дер-Ваальсовых взаимодействий получены с помощью пакета XPLO2D. Значения ван-дер-Ваальсовых радиусов и зарядов для атомов РНК, использованных в настоящей работе, соответствуют силовому полю AMBER для нуклеиновых кислот.

Структуры комплексов лиганд-РНК.

Для получения комплексов антибиотик-РНК с помощью программы HyperChem 8.0 были модифицированы структуры Neo-Asite 16S рРНК и Par-Asite 16S рРНК из Protein Data Bank (pdb коды 2et4 и 1j7t соответственно).

Явное задание водного окружения производилось с помощью молекул воды модели TIP3P [6], размещенных в кубическом боксе с длиной ребра 45 Å. Нейтрализация зарядов фосфатов РНК осуществлялась 8 ионами Na, размещенными на расстояниях 6 Å от атомов фосфора на биссектрисах углов O1P-P-O2P.

Молекулярная динамика.

Расчет конформационной динамики комплексов антибиотик-РНК в процессе теплового движения выполнен с помощью программы X-PLOR. Оптимизация геометрии комплексов антибиотик-РНК выполнялась путем минимизации потенциальной энергии методом сопряженных градиентов. На первом

етапе мінімізації координати атомів 27-мера і ліганда фіксувались, що дозволяло найближчим до них молекулам води релаксувати до рівноважних положень. Другий етап проводився при фіксованих атомах 27-мера, а кінцева стадія мінімізації виконувалась без якихось обмежень на рух атомів системи.

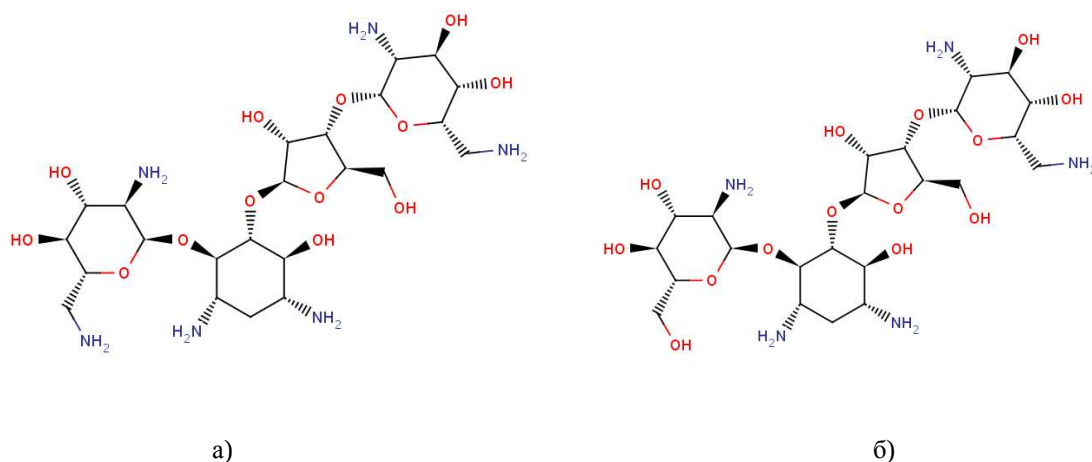


Рисунок 1 – Структурні формули аміноглікозидних антибіотиків: неоміцина (а) і паромоміцина (б)

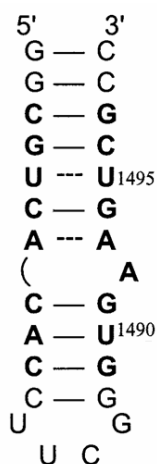


Рисунок 2 – Шпильчатая структура 27-мера А сайта РНК [5]

Після мінімізації потенціальної енергії виконувалась процедура молекулярної динаміки за алгоритмом Verlet з часовим кроком $\Delta t = 2$ фс і використанням алгоритму SHAKE при постійній температурі $T = 298$ К. В процесі моделювання фіксувалась зовнішня водна оболонка для перешкоди виходу молекул води в вакуум. Вільний (нефіксований) водний шар відповідав товщині ближньої гідратної оболонки, тобто біомолекулярному шару в ≈ 4 Å. Сумарне час еволюції складало 2 нс. Координати всіх атомів записувались кожну 1 пс.

Середні кількості молекул води, що формують водородні зв'язки з гідрофільними атомами (N, O) молекул РНК і антибіотиків (гідратаційні індекси), розраховувались за траєкторіями теплового руху протягом останніх 40 пс молекулярної динаміки. Наявність водородних зв'язків фіксувалось, якщо відстані між електронегативними атомами молекул і атомами кисню (водню) води не перевищували 3.2 (2.4) Å, відповідно.

Розрахунок площі поверхні, доступної розчиннику (solvent accessible surface areas – SASA) в цій роботі проводився за допомогою програми HyperChem 8.0. SASA представляє собою площу геометричного місця центра пробної сфери з радіусом, рівним ван-дер-Ваальсовому радіусу молекули води (1.4 Å), при її русі по ван-дер-Ваальсовій поверхні молекули розчиненої речовини або комплексу.

Результати і обговорення

Загальний підхід до розрахунку складових сумарної енергії Гіббса комплексоутворення антибіотиків з РНК.

В роботі [4] розроблена методика розрахунку вкладів основних фізичних взаємодій в загальну енергію Гіббса реакцій комплексоутворення. Ця методика ґрунтується на записі наступного рівняння:

$$\Delta G = \Delta G_{conf} + \Delta G_{VDW} + \Delta G_{el} + \Delta G_{pe} + \Delta G_{HB} + \Delta G_{hyd} + \Delta G_{entr}, \quad (1)$$

де ΔG_{conf} – вклад конформаційних змін в РНК при зв'язуванні антибіотика; ΔG_{VDW} – вклад ван-дер-Ваальсових взаємодій; ΔG_{el} – вклад змін електростатичної енергії; ΔG_{pe} –

полиэлектrolитный вклад; ΔG_{HB} – вклад водородных связей; ΔG_{hyd} – гидрофобный вклад; ΔG_{entr} – энергетический эквивалент изменения ротационных и трансляционных степеней свободы при комплексообразовании.

При этом составляющая ΔG_{entr} обусловлена потерей трансляционных (ΔG_{tr}) и ротационных (ΔG_{rot}) степеней свободы молекул при образовании комплекса:

$$\Delta G_{entr} = \Delta G_{tr} + \Delta G_{rot} . \quad (2)$$

Так как процесс комплексообразования происходит в водной среде, а взаимодействие с водной средой, помимо гидрофобного вклада ΔG_{hyd} , включает также ван-дер-Ваальсовы, электростатические взаимодействия и водородные связи с молекулами воды [4], то полный энергетический анализ должен содержать разделение суммарной энергии на внутри- и межмолекулярные взаимодействия РНК и лиганда ΔG_{im} , и их взаимодействие с водной средой ΔG_{solv} :

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{im} + \Delta G_{solv} . \quad (3)$$

Выражения (1)-(3) составляют основу решаемой в настоящей работе задачи расчета вкладов различных физических факторов в суммарную энергию комплексообразования.

Анализ энергетического вклада ван-дер-Ваальсовых взаимодействий ΔG_{VDW}

Расчет ван-дер-Ваальсовых энергий (ВДВ) проводился с помощью программы X-PLOR. Усредненные в ходе молекулярной динамики расчетные значения энергий приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Расчетные значения энергий ван-дер-Ваальсовых взаимодействий (ккал/моль) при комплексообразовании аминокликозидных антибиотиков с 27-мером РНК

Лиганд	ΔG_{VDW}^{im}	ΔG_{VDW}^{solv}	ΔG_{VDW}^{total}
Neo	-58,3	53	-5,3
Par	-51,1	41,3	-9,8

Как видно из таблицы 1 межмолекулярная энергия взаимодействия антибиотиков с РНК ΔG_{VDW}^{im} отрицательна и отражает характер притяжения ван-дер-Ваальсовых сил. В то же время энергия взаимодействия комплекса с водой ΔG_{VDW}^{solv} положительна за счет дегидратации лиганда в процессе комплексообразования. Суммарное значение энергий ВДВ для молекул Neo и Par отрицательно, что говорит о стабилизации комплексов антибиотик-РНК за счет ван-дер-Ваальсовых взаимодействий.

Анализ энергетического вклада электростатических взаимодействий ΔG_{el}

В данной работе расчет энергетического вклада электростатических взаимодействий осуществлен методом Пуассона-Больцмана. Данный метод подробно описан в работе [7]. Приведем лишь основные результаты расчетов энергии электростатических взаимодействий при связывании неомицина и паромомицина с 27-мером РНК (таблица 2).

Таблица 2 – Расчетные значения энергий электростатических взаимодействий (ккал/моль) при связывании антибиотиков с 27-мером РНК

Лиганд	Заряд	ΔG_{el}^{im}	ΔG_{el}^{solv}	ΔG_{el}^{total}
Neo	+6	-1168,7	1162,7	-6,0
Par	+5	-1082,7	1077,5	-5,2

Результирующий электростатический вклад определяется суммой двух больших чисел с противоположными знаками: взаимодействия комплекса с водной средой ΔG_{el}^{solv} , и кулоновских взаимодействий атомных зарядов лиганда и РНК, ΔG_{el}^{im} . Расчет показывает, что для двух рассмотренных систем электростатические взаимодействия играют роль стабилизирующего фактора. Данные результаты коррелируют с расчетами энергии электростатических взаимодействий при комплексообразовании Neo и Par с малой (30S) субъединицей рибосомы [8].

Полиэлектrolитный вклад в энергию комплексообразования антибиотиков с РНК, ΔG_{pe}

Для комплексообразования неомицина и паромомицина с 27-мером РНК составляющая ΔG_{pe} была ранее определена экспериментально [5] (таблица 3). Полиэлектrolитный вклад способствует

образованию комплекса антибиотик-РНК и носит преимущественно энтропийный характер, обусловленный энтропийно выгодным высвобождением противоионов при комплексообразовании лигандов с РНК.

Таблица 3 – Полиэлектролитный вклад в энергию комплексообразования антибиотиков с РНК

Лиганд	ΔG_{pe} , ккал/моль
Neo	-3,9 [5]
Par	-3,8 [5]

Анализ энергетического вклада водородных связей, ΔG_{HB} .

Методика расчета водородных связей подробно описана в работе [4]. Согласно данной методике расчет числа водородных связей основывается на расчете количества межмолекулярных водородных связей между лигандом и РНК в пределах сайта связывания (N_{im}), и расчете потери водородных связей с молекулами воды в процессе дегидратации лиганда при образовании комплекса (N_{solv}). Число межмолекулярных водородных связей N_{im} известно из литературных данных [5] и согласуется с расчетным числом Н-связей в моделируемой структуре.

Энергетический вклад Н-связей ΔG_{HB} , согласно [4], имеет вид:

$$\Delta G_{HB} = -0.25 \cdot 9 \cdot (N_{im} + N_{solv}).$$

Таблица 4 – Энергетический вклад водородных связей

Лиганд	N_{im}	N_{solv}	ΔG_{HB} , ккал/моль
Neo	11 [5]	-21,3	23,2
Par	8 [5]	-19,1	25,0

Из таблицы 4 следует, что основным фактором, определяющим энергетический вклад водородных связей, является процесс дегидратации лиганда, препятствующий формированию комплекса лиганд-РНК.

Анализ гидрофобного вклада ΔG_{hyd}

Расчет гидрофобного вклада в энергию комплексообразования аминогликозидных антибиотиков с РНК в настоящей работе выполнен на основании известной корреляции энергии гидрофобного растворения ΔG_{hyd} и изменении площади поверхности, доступной растворителю ΔA [4] (таблица 5):

$$\Delta G_{hyd} = \gamma \cdot \Delta A,$$

где γ – микроскопический коэффициент поверхностного натяжения, $\gamma = 50$ кал/(моль·Å²).

Таблица 5 – Площади поверхностей молекул и их комплексов (Å²) и соответствующий гидрофобный вклад ΔG_{hyd} (ккал/моль)

Лиганд	Площадь лиганда	Площадь РНК	Площадь комплекса	Изменение площади	ΔG_{hyd}
Neo	834,2	5506,3	5498,5	-842	-42,1
Par	829,0	5506,3	5567,9	-767,4	-38,4

Следует отметить, что значение ΔA (таблица 5), рассчитанное для комплекса паромоцин-шпилечная структура А сайта РНК, коррелируют с результатами расчета SASA для комплекса паромоцин-А сайт РНК [9]. Анализ расчетных значений ΔG_{hyd} позволяет сделать вывод о том, что гидрофобные взаимодействия способствуют образованию комплексов лиганд-РНК.

Энтропийный вклад ΔG_{entr} .

Энтропийный вклад в энергетику комплексообразования антибиотиков с РНК обусловлен изменением числа трансляционных и ротационных степеней свободы (см. уравнение (2)). Компоненты ΔG_{tr} и ΔG_{rot} возникают благодаря потере трех трансляционных и трех ротационных движений при комплексообразовании. Аналитические выражения для расчета трансляционных и ротационных составляющих получены в работе [4]. Для расчета ΔG_{rot} требуется знание моментов инерции лиганда,

27-мера РНК и комплекса лиганд-РНК, которые в настоящей работе получены с помощью программы X-PLOR.

Как следует из таблицы 6, составляющие ΔG_{tr} и ΔG_{tot} являются преимущественно энтропийными по своей природе ($|T\Delta S| > |\Delta H|$) и дают неблагоприятный вклад в общую энергию комплексообразования. Такой результат является вполне ожидаемым, учитывая энтропийную невыгодность потери трех ротационных и трансляционных степеней свободы при связывании лиганда с РНК.

Таблица 6 – Энергетический вклад энтропийных составляющих (ккал/моль) при комплексообразовании антибиотиков с 27-мером РНК

Лиганд	Трансляционные			Ротационные			ΔG_{entr}
	ΔH	$-T\Delta S$	ΔG	ΔH	$-T\Delta S$	ΔG	
Neo	-0,9	-11,5	10,6	-0,9	-11,5	10,7	21,3
Par		-11,5	10,6		-11,5	10,6	21,2

Анализ вклада конформационной составляющей ΔG_{conf}

Исследования связывания аминогликозидных антибиотиков с РНК кристаллографическим методом и методом ЯМР показали, что связывание антибиотиков приводит к локальным изменениям в А сайте РНК, которые сопровождаются смещением оснований A1492 и A1493 (рисунок 2) в направлении малой канавки [3]. Локальные изменения приводят к дестекингу оснований A1492 и A1493. В работе [5] показано, что изменение конформационной энергии, возникающее в результате дестекинга оснований, составляет порядка 1 ккал/моль, в связи с чем в настоящей работе было принято $\Delta G_{conf} \approx 1$ ккал/моль.

Анализ суммарной энергии комплексообразования антибиотик-РНК

В таблице 7 приведены расчетные значения вкладов различных физических факторов в суммарную энергию комплексообразования, и экспериментальное значение свободной энергии Гиббса.

Таблица 7 – Составляющие общей энергии комплексообразования в системе аминогликозидный антибиотик-РНК (ккал/моль)

Лиганд	ΔG_{vdw}	ΔG_{el}	ΔG_{HB}	ΔG_{hyd}	ΔG_{entr}	ΔG_{pe}	ΔG_{conf}	ΔG_{total}	ΔG_{exp}
Neo	-5,3	-6,0	23,2	-42,1	21,3	-3,9	1	-11,8	-11,5 [5]
Par	-9,8	-5,2	25	-38,4	21,2	-3,8	1	-10,0	-10,3 [5]

Из таблицы 7 следует, что относительно невысокие экспериментальные энергии комплексообразования антибиотиков с РНК являются результатом компенсации больших по модулю и противоположных по знаку энергий на уровнях внутри- и межмолекулярных взаимодействий, и взаимодействия с водной средой, а также на уровне суммирования отдельных энергетических составляющих, относящихся к конкретным видам физических взаимодействий.

Препятствуют связыванию аминогликозидных антибиотиков с 27-мером РНК водородные связи, локальные конформационные изменения молекулы РНК при образовании комплекса и энтропийные факторы. Стабилизирующими комплексы факторами являются электростатические, ван-дер-Ваальсовы и гидрофобные взаимодействия.

Считается, что высокое сродство аминогликозидных антибиотиков к А сайту РНК определяется стабилизирующими комплекс электростатическими взаимодействиями [5, 10], что согласуется с полученными в настоящей работе результатами. Однако, в отличие от предыдущих исследований, в данной работе проведена оценка вклада основных видов физических факторов в полную энергию Гиббса реакций комплексообразования антибиотиков с РНК.

Перспективой дальнейших исследований является использование полученных в настоящей работе результатов для исследования связывания аминогликозидных антибиотиков с более сложными структурами РНК.

Библиографический список использованной литературы

1. Forge A. Aminoglycoside antibiotics / A. Forge, J. Schacht // Audiol. Neurotol. — 2000. — Vol. 5. — P. 3–22.
2. Gutell R. R. Collection of small subunit (16S- and 16S-like) ribosomal RNA structures: 1994 / R.R. Gutell // Nucleic Acids Res. — 1994. — Vol. 22. — P. 3502–3507.

3. Fourmy D. Structure of the A Site of Escherichia coli 16S Ribosomal RNA Complexed with an Aminoglycoside Antibiotic / D. Fourmy, M.I. Recht, S.C. Blanchard, J.D. Puglisi // Science. — 1996. — Vol. 274. — P. 1367–1371.
4. Kostjukov V. V. Partition of thermodynamic energies of drug-DNA complexation / V.V. Kostjukov, N. M. Khomytova, M.P. Evstigneev // Biopolymers. — 2009. — Vol. 91. — N 9. — P. 773–790.
5. Pilch D.S. Thermodynamics of aminoglycoside-rRNA recognition / D.S. Pilch, M. Kaul, C.M. Barbieri, J.E. Kerrigan // Biopolymers. — 2003. — Vol. 70. — P. 58–79.
6. Jorgensen W. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water / W. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. Impey, M. Klein // J. Chem. Phys. — 1983. — Vol. 79. — P. 926–935.
7. Kostjukov V.V. Electrostatic contribution to the energy of binding of aromatic ligands with DNA / V.V. Kostjukov, N.M. Khomytova, D.B. Davies, M.P. Evstigneev // Biopolymers. — 2008. — Vol. 89. — P. 680–690.
8. Ma C. Binding of aminoglycoside antibiotics to the small ribosomal subunit: a continuum electrostatics investigation / C. Ma, N.A. Baker, S. Joseph, J.A. McCammon // J. Am. Chem. Soc. — 2002. — Vol. 124. — N 7. — P. 1438–1442.
9. Barbieri C.M. Deciphering the origins of observed heat capacity changes for aminoglycoside binding to prokaryotic and eukaryotic ribosomal RNA A-sites: a calorimetric, computational, and osmotic stress study / C.M. Barbieri, A.R. Srinivasan, D.S. Pilch // J. Am. Chem. Soc. — 2004. — Vol. 126. — P. 14380–14388.
10. Wang H. Electrostatic interactions in RNA aminoglycosides binding / H. Wang, Y. Tor // J. Am. Chem. Soc. — 1997. — Vol. 119. — P. 8734–8735.

Поступила в редакцію 30. 06.2010 г.

Бешнова Д.О. Енергетичний аналіз комплексоутворення аміноглікозидних антибіотиків з РНК

В даній роботі проведено розрахунок внесків основних фізичних взаємодій в повну енергію комплексоутворення аміноглікозидних антибіотиків з 27-міром РНК. Показано, що електростатичні, ван-дер-Ваальсові та гідрофобні взаємодії сприяють комплексоутворенню антибіотиків з РНК. Водневі зв'язки, конформаційні та ентропійні складові є енергетично не вигідними.

Ключові слова: комплексоутворення, аміноглікозидні антибіотики

Beshnova D.A. Energy analysis of complexation of aminoglycoside antibiotics with RNA

The calculation of contributions of the main physical interactions to the complexation energy of aminoglycoside antibiotics with 27-mer RNA is conducted in the article. It is shown that electrostatic, van-der-Waals, and hydrophobic interactions favor the complexation of antibiotics with RNA. H-bonds, conformational and entropy terms appear to be energetically unfavorable.

Keywords: complexation, aminoglycoside antibiotics.