

УДК 577.182.62;577.217.347

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРОИЗВОДНЫХ ЭРИТРОМИЦИНА С РИБОСОМОЙ

© 2015 А.В. Шишкина¹, Т.М. Макарова², А.Г. Терещенков²,
Г.И. Макаров², Г.А. Коршунова^{1*}, А.А. Богданов¹

¹ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова;
электронная почта: korsh@genebee.msu.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991, Москва; факс: +7(495)939-3181

Поступила в редакцию 06.07.15
После доработки 24.07.15

Методом статического моделирования осуществлен дизайн ряда аналогов эритромицина А, содержащих в структуре альдегидные группы, введенные вместо одного из метильных заместителей в положение 3'-N антибиотика и потенциально способные образовывать ковалентную связь с аминогруппой одного из нуклеотидных остатков 23S рРНК в рибосомном туннеле. Подобное взаимодействие наблюдается для антибиотиков тилозинового ряда, которые очень прочно связываются с большой субъединицей рибосомы и обладают высокой антибактериальной активностью. Связывание новых производных эритромицина с бактериальной рибосомой изучено методом поляризации флуоресценции. Показано, что наилучшим связыванием обладает аналог эритромицина, содержащий в 3'-N-положении 1-метил-3-оксопропильную группу. По способности ингибировать биосинтез белка он находится на уровне эритромицина и значительно превосходит дезметилэритромицин. Для объяснения наблюдаемых эффектов проведено молекулярно-динамическое моделирование комплексов полученных производных с рибосомой.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибосомный туннель, макролиды, эритромицин, моделирование.

Макролиды представляют собой семейство природных или полусинтетических антибиотиков, родовым признаком которых является макроциклическое 14–16-членное лактонное кольцо, замещенное одним или более остатками сахаров. Среди макролидов наиболее широко применяются в клинической практике эритромицин и его производные – рокситромицин, кларитромицин и азитромицин [1]. Это объясняется в т.ч. и тем, что 14-членные макролиды не подавляют функционирование митохондриальных и цитоплазматических рибосом эукариот и поэтому малотоксичны для организма человека [2].

Полный синтез макролидов оказался слишком сложной задачей из-за наличия большого количества асимметрических центров. Напри-

мер, эритромицин А только в лактонном кольце содержит десять таких центров, поэтому новые соединения этого семейства получают химической модификацией природных антибиотиков.

Макролиды относятся к антибиотикам широкого спектра действия на грамположительные и некоторые грамотрицательные бактерии. Молекулярной мишенью макролидов является 50S субъединица бактериальной рибосомы. Они связываются в первой трети рибосомного туннеля ниже пептидилтрансферазного центра (ПТЦ). Методом рентгеноструктурного анализа (РСА) комплексов рибосомы с антибиотиками были установлены точное расположение и конформация макролидов в рибосомном туннеле (РТ). Макролиды связываются с элементами РТ за счет гидрофобных взаимодействий своей так называемой «гидрофобной стороны», образуемой однонаправленно сориентированными гидрофобными заместителями, а также с помощью водородных связей с основаниями 23S рРНК [3].

Особое семейство рибосомных антибиотиков представляют тилозин и родственные ему макролиды, содержащие 16-членное лактонное

Принятые сокращения: ПТЦ – пептидилтрансферазный центр; РСА – рентгеноструктурный анализ; РТ – рибосомный туннель; ТСХ – тонкослойная хроматография; LC-MS – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией; BODIPY – 5,7-диметил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диазо-8-индацен-3-пентановая кислота; DIPFA – диизопропилэтиламин; Ery – эритромицин.

* Адресат для корреспонденции.

кольцо, в С6-положении которых находится ацетальдегидная группа. При их связывании с рибосомой альдегидная группа антибиотика обратимо взаимодействует с N6-атомом нуклеотида A2062 23S рРНК с образованием полуаминала (рис. 1).

Было показано, что превращение альдегидной группы тилозина в спиртовую или метильную приводит к существенной потере его антимикробной активности [4]. Недавно нами также было подтверждено, что восстановление альдегидной группы тилозина приводит к резкому снижению его способности конкурировать с эритромицином за место связывания на рибосоме [5]. С целью увеличения аффинности антибиотика к рибосоме нами была поставлена задача на основе предварительного моделирования модифицировать эритромицин таким образом, чтобы он оказался способным, подобно тилозину, образовывать полуаминал в РТ с основаниями 23S рРНК.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовался эритромицин А фирмы «Fluka» (Германия), а также реагенты и растворители фирм «Merck» (Германия) и «Reanal» (Венгрия). Для ТСХ применяли пластины Silicagel 60 F 254 («Merck», Германия). Для колоноч-

ной хроматографии использовали силикагель Silicagel 60 (0,040–0,063 мм) («Merck», Германия). Хроматографию проводили в системах растворителей: (1) AcOEt : MeOH : Et₃N – 12 : 4 : 1; (2) AcOEt : MeOH : Et₃N – 30 : 6 : 1; (3) CHCl₃ : MeOH – 9 : 1. Молекулярную массу и хроматографическую индивидуальность подтверждали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC-MS) на хроматографе Acquity UPLC System («Waters», США) с tandemным квадрупольным МС-детектором TQD («Waters», США) в режиме регистрации положительных ионов с градиентом 0–95% CH₃CN в 0,1%-ной ТФУ за 3 мин.

3'-N-дезметилэритромицин А (II). Синтез проводили по методике, описанной в работе Фрейберг [6], исходя из 5,00 г (6,81 ммоль) эритромицина А (I), 4,68 г (34,4 ммоль) CH₃CO₂Na × 3H₂O и 1,75 г (6,81 ммоль) I₂. Выход составлял 1,7 г (34%). ТСХ: R_f (1) 0,35. LC-MS: найдено 721,0 [M + H⁺], вычислено для C₃₆H₆₅NO₁₃ – 719,9; дезааминовый фрагмент в спектре LC-MS: найдено 144,2, вычислено для C₇H₁₄NO₂ – 144,1; t_R = 1,21.

3'-N-(2,2-диэтокси)этил-3'-N-дезметилэритромицин А (III). 100 мг (0,139 ммоль) соединения II растворяли в 600 мкл CH₃CN, добавляли 418 мкл (2,78 ммоль) BrCH₂CH(OC₂H₅)₂ и 243 мкл (1,39 ммоль) DIPEA. Реакционную смесь выдерживали при 50° в течение 72 ч, затем смешивали с 20 мл воды. Продукт экстрагировали этилаце-

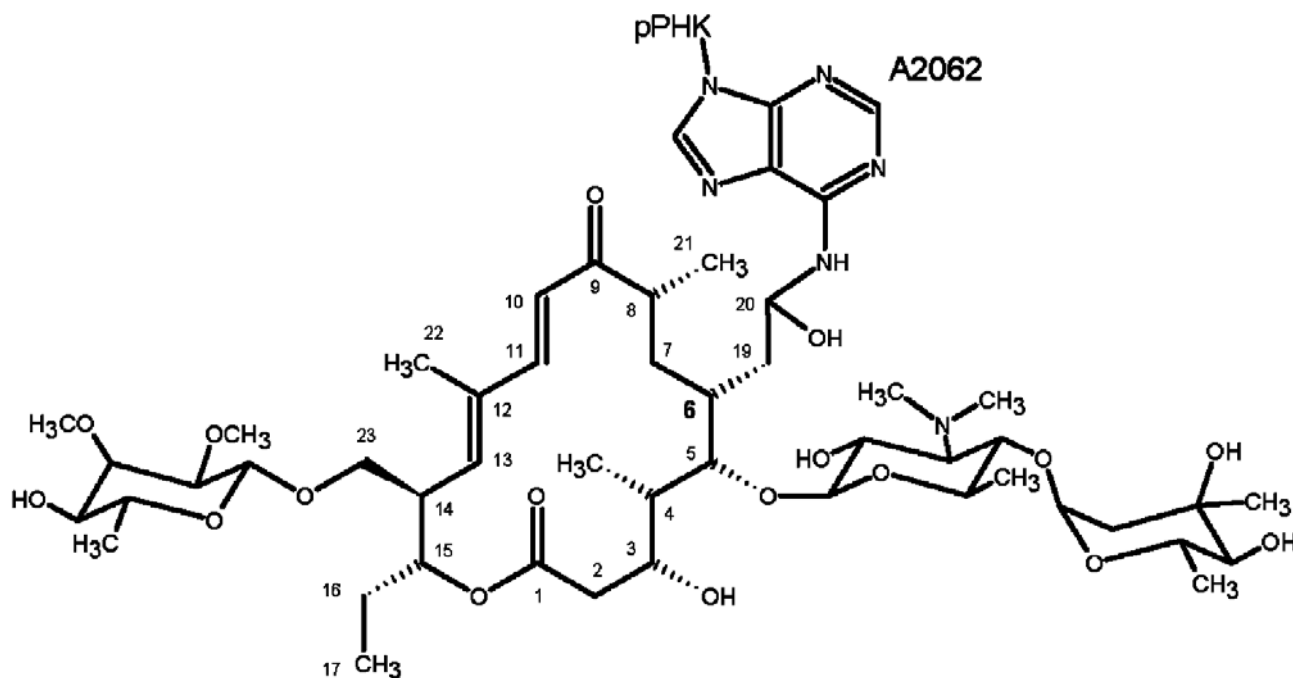


Рис. 1. Схема образования полуаминала между альдегидной группой тилозина и аминогруппой A2062 23S рРНК

татом, экстракт промывали 10 мл 5%-ного водного раствора NaHCO_3 , затем – 10 мл насыщенного водного раствора NaCl и высушивали прокаленным MgSO_4 . Растворитель удаляли в вакууме, продукт реакции осаждали добавлением гексана и очищали колоночной хроматографией в системе (2). Выход соединения III составлял 25 мг (22%). ТСХ: R_f (1) 0,60, R_f (2) 0,50. LC-MS: найдено 837,1 $[\text{M} + \text{H}^+]$, вычислено для $\text{C}_{42}\text{H}_{77}\text{NO}_{15}$ – 836,0; $t_R = 1,63$ мин.

3'-N-(2-оксоэтил)-3'-N-дезметилэритромицин А (IV). 25 мг (0,035 ммоль) соединения III растворяли в 300 мкл CH_2Cl_2 и добавляли 15 мг (0,042 ммоль) $\text{BiNO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$. Смесь активно перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч, затем смешивали с 10 мл воды, экстрагировали этилацетатом, экстракт промывали 5 мл 5%-ного раствора NaHCO_3 , затем 5 мл насыщенного раствора NaCl , сушили над прокаленным MgSO_4 . После удаления растворителя в вакууме выход соединения IV составлял 18 мг (78%). ТСХ: R_f (1) 0,83, R_f (2) 0,76. LC-MS: найдено 762,9 $[\text{M} + \text{H}^+]$, вычислено для $\text{C}_{38}\text{H}_{67}\text{NO}_{14}$ – 761; дезоаминовый фрагмент в спектре LC-MS: найдено 186,3, вычислено для $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{NO}_3$ – 186,2; $t_R = 1,32$ мин.

3'-N-(1-метил-3-оксопропил)-3'-N-дезметилэритромицин А (V). 100 мг (0,139 ммоль) соединения II растворяли в 300 мкл (3,06 ммоль) кротонного альдегида и выдерживали 96 ч при 50°. Реакционную смесь упаривали досуха. Продукт очищали с помощью колоночной хроматографии в системе (3). Выход соединения V составлял 25 мг (23%). ТСХ: R_f (3) 0,65. LC-MS: найдено 791,1 $[\text{M} + \text{H}^+]$, вычислено для $\text{C}_{40}\text{H}_{71}\text{NO}_{14}$ – 789,9; дезоаминовый фрагмент в спектре LC-MS: найдено 214,3, вычислено для $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{NO}_3$ – 214,2; $t_R = 1,32$ мин.

Изучение связывания антибиотиков с рибосомами методом поляризации флуоресценции. В работе использованы 70S бактериальные рибосомы *E. coli* штамма BW25113, выделенные по стандартной методике Нолл с соавт. [7], чувствительные к антибиотикам класса макролидов. Концентрация рибосом определялась по оптической плотности при длине волны 260 нм ($A_{260} = 1$ о.е. при $C(R_s) = 24$ пмоль/мл). Для приготовления растворов был использован буфер BIND (20 мМ HEPES-KOH , pH 7,5, 50 мМ NH_4Cl , 10 мМ MgCl_2 , 0,05%-ный Tween 20). Измерение констант диссоциации исследуемых веществ было проведено методом конкурентного вытеснения ими флуоресцентно-меченого эритромицина (BODIPY-Ery) из его комплекса с рибосомами. Рибосомы *E. coli* инкубировали при 37° в течение 15 мин и затем разбавляли в буфере BIND. BODIPY-Ery (4 нМ), полученный по методике

Йан с соавт. [8], инкубировали с рибосомами (17 нМ) в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее образовавшийся комплекс переносили в 384-луночный планшет и добавляли в лунки раствор вытесняющего лиганда (соединения I, II, IV, V) в концентрациях от 1 нМ до 10 мкМ так, что общий объем составлял 50 мкл. Полученную смесь инкубировали 1,5 ч для достижения равновесия и затем измеряли значения поляризации флуоресценции с помощью мультиридера VICTOR™ X5 Multilabel Plate Reader («Perkin Elmer», США; длина волны возбуждающего света $\lambda_{ex} = 485$ нм, длина волны, при которой измерялось испускание, $\lambda_{em} = 530$ нм). Коррекция G-фактора была проведена с использованием флуоресцеинового стандарта. Время измерения каждой ячейки составляло 1 с. Измеренные значения поляризации флуоресценции были переведены в анизотропию (mA). Аппроксимацию полученных данных проводили с помощью функции, соответствующей решению кубического уравнения, описывающего конкурентное связывание двух лигандов в одном сайте [9], с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6. Константа диссоциации комплекса BODIPY-Ery с рибосомой была измерена ранее и составляла 16,4 нМ. Расчет констант диссоциации комплексов полученных производных с рибосомами проводили на основе четырех повторных измерений и приводили среднее значение \pm s.d.

Ингибирование трансляции *in vitro*. Для трансляции *in vitro* использовали S30 экстракт *E. coli* и мРНК *Renilla luciferase*. Реакцию осуществляли по методике Светлова с соавт. [10]. Концентрация мРНК составляла 20 нг/мкл, концентрация антибиотиков – 1 мкМ. Измерения проводили спустя 1 ч после начала трансляции. Для этого к продукту трансляции добавляли коммерческий реактив Renilla Luciferase Assay System («Promega», США) и измеряли интенсивность хемилюминесценции на люминометре 20/20n («Turner Biosystems», США). Количество синтезированной люциферазы было пропорционально значению интенсивности люминесценции, регистрируемой при расщеплении люциферина. Значение остаточного уровня трансляции вычисляли как отношение интенсивности люминесценции в системе с антибиотиком к интенсивности люминесценции в эксперименте без ингибиторов трансляции.

Молекулярно-динамическое моделирование. Стартовая система была сконструирована на основе кристаллической структуры комплекса 70S рибосомы *E. coli* с эритромицином, полученной методом РСА с разрешением 3,1 Å (код PDB: 4V7U) [11]. Исследуемые производные распола-

гали в РТ вместо исходного эритромицина. Для дальнейшего расчета были выделены все остатки рибосомы, у которых хотя бы один атом попадал в кубическую область с ребром длиной 7 нм, включающую в себя весь РТ и ПТЦ так, что центр этой области находился в туннеле, а сам туннель пролегал вдоль мысленной оси аппликата.

Все расчеты молекулярной динамики и анализ полученных траекторий движения атомов проводились с помощью пакета программ GROMACS [12, 13] версий 4.5.4 и 4.6.5 и силового поля parm99sb. Все расчетные эксперименты выполнялись при температуре 300 К под управлением термостата масштабирования скоростей с добавочным стохастическим членом [14] и баростата Берендсена [15]. Электростатические взаимодействия обрабатывались посредством сети частиц Эвальда [16]. Моделируемая система была центрирована в кубической ячейке с ребром 10 нм, заполненной молекулами воды TIP4P [17] так, что грани системы были покрыты слоем растворителя толщиной 0,40–0,65 нм. Отрицательный заряд системы был нейтрализован ионами Mg^{2+} и Na^+ . Ионы Mg^{2+} добавляли так, чтобы они образовывали «магниево-мостики» между соседними фосфатными группами, а ионы Na^+ располагали вблизи отрицательно заряженных групп, чтобы компенсировать остаточный отрицательный заряд [18]. Остатки, хотя бы один атом которых находится в пределах 0,1 нм от грани моделируемого участка рибосомы, были позиционно ограничены, при этом все остальные атомы могли свободно двигаться. Временной шаг интегрирования во всех вычислениях составлял 2 фс, координаты записывались в файл траектории каждые 60 пс. Графическое отображение полученных данных, а также статическое моделирование комплексов производных эритромицина А с рибосомой *E. coli* проводили с помощью программы PyMol 1.5.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн и синтез производных эритромицина.

На первом этапе работы был проведен поиск возможных сайтов модификации эритромицина А с целью получения производных, способных образовывать ковалентную связь с аминогруппой одного из оснований в области связывания макролидов с РТ. Для этого были проанализированы данные РСА комплекса эритромицина с рибосомой *E. coli* (код PDB: 4V7U), и с использованием этой структуры было проведено статическое моделирование новых производных. Наиболее подходящими с точки зрения сближен-

ности с аминогруппами оснований 23S рРНК оказались положения 6-О и 3'-N эритромицина А: расстояние от ближайшей N6-аминогруппы аденина до 6-О-атома составляет 5,2 Å (A2062), а до 3'-N-атома — 4,6 Å (A2059). Исходя из структуры комплекса, были подобраны такие альдегидсодержащие заместители для этих атомов, которые могли бы, реагируя с аминогруппой аденина, образовывать полуаминали, не изменяя положения антибиотика.

В соответствии с данными моделирования в 6-О-положение эритромицина нужно было бы ввести 3-оксопропильный или даже 4-оксобутильный фрагмент. Однако объемные гидрофобные заместители могут повлиять на положение эритромицина в РТ; кроме того, они неспособны обеспечить достаточной жесткости связывания нуклеотида с антибиотиком. Известно также, что введение более короткого — 2-оксоэтильного — заместителя в 6-О-положение приводит к снижению антибактериальной активности полученного соединения [19]. В связи с этим мы сосредоточились на синтезе альдегидных производных эритромицина по положению 3'-N.

Согласно статическому моделированию замена одной из 3'-N-метильных на 2-оксоэтильную группу позволяет карбонильному атому сблизиться с атомом азота аминогруппы A2059 на расстояние вплоть до 1,9 Å (рис. 2). Принимая во внимание закономерно существующую подвижность структуры антибиотика в РТ и нуклеотидов 23S рРНК, небольшое смещение остатка дезозамина или основания A2059 может привести к преодолению дистанционных ограничений и образованию ковалентной связи. Введение 3-оксопропильного заместителя в 3'-N-по-

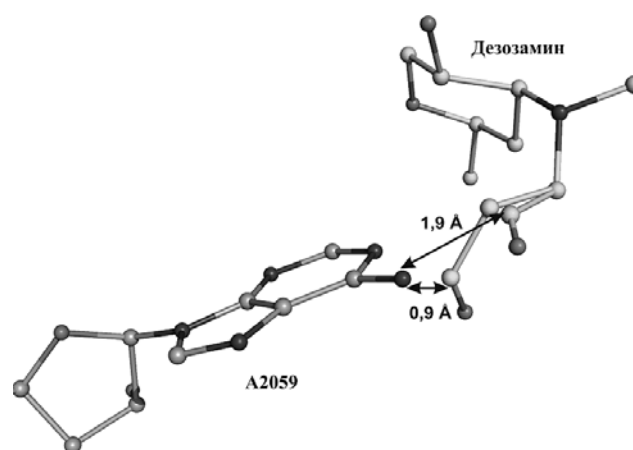


Рис. 2. Предполагаемые конформации 2-оксоэтильной и 3-оксопропильной группировок 3'-N-дезметилэритромицина А (показан только остаток дезозамина) в РТ

ложение также позволяет этим атомам сблизиться на расстояние, достаточное для их взаимодействия.

Таким образом, в качестве целевых соединений были выбраны производные эритромицина А, содержащие альдегидную группу на расстоянии одной или двух метиленовых групп от атома азота дезоамина.

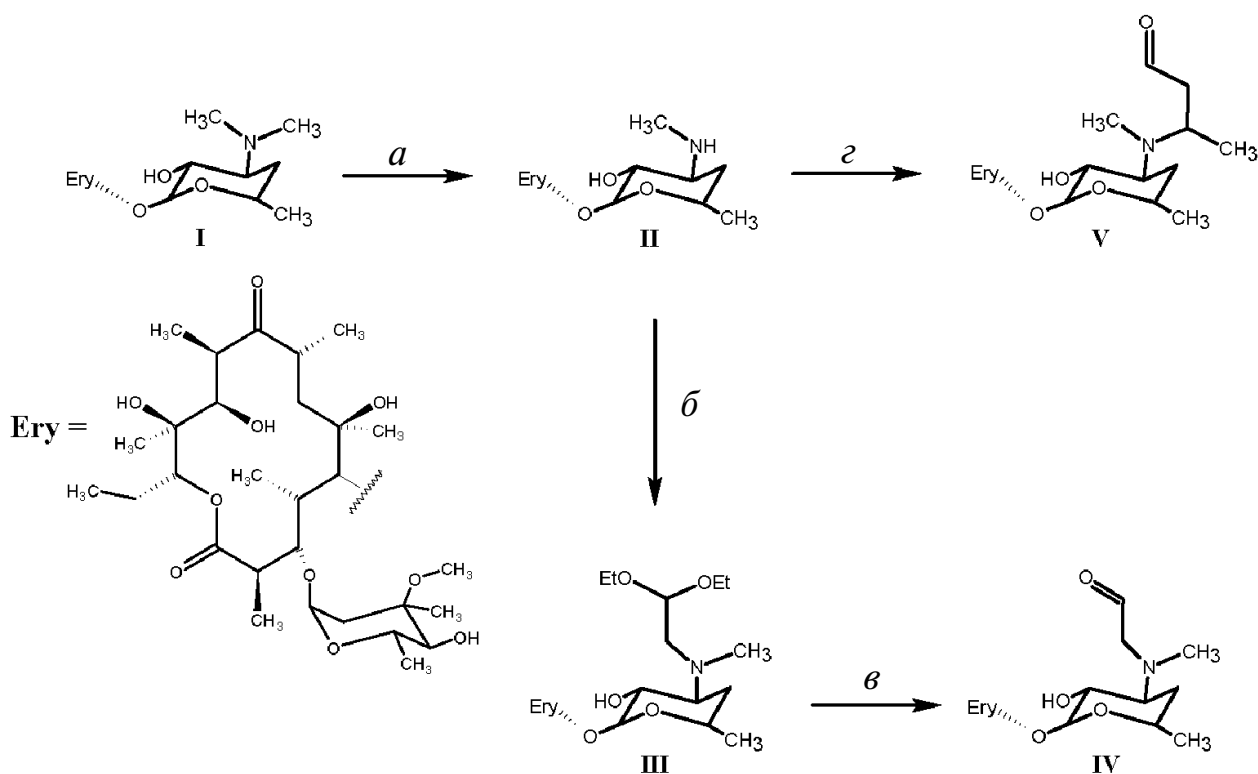
Из исходного эритромицина А (**I**) был получен 3'-N-дезметилэритромицин А (**II**) по известной методике – реакцией с йодом при слабом нагревании в присутствии основания. Алкилирование соединения **II** проводилось 20-кратным избытком (2,2-диэтокси)этилбромида при 50°. Полученный диэтилацеталь (**III**) гидролизовали в мягких условиях без использования кислот соединениями висмута (**III**) [20]. При этом было получено хроматографически индивидуальное соединение **IV** (схема).

3'-N-(1-метил-3-оксипропил)-3'-N-дезметилэритромицин А (**V**) получали присоединением по Михаэлю кротонового альдегида ко вторичной аминогруппе 3'-N-дезметилэритромицина А (**II**) (схема).

Производные были очищены до хроматографически индивидуального состояния и масс-спектрометрически подтверждены с помощью

методов LC-MS. Локализация заместителя по дезоаминовому фрагменту была подтверждена характерным для производных эритромицина фрагментом модифицированного дезоамина в спектре LS-MS.

Измерение констант диссоциации комплексов антибиотиков с рибосомой. Степень сродства полученных соединений к сайту связывания макролидов в рибосоме исследовали методом поляризации флуоресценции. Флуоресцентно-меченый эритромицин BODIPY-Ery [16] вытеснялся исследуемыми соединениями из его комплекса с рибосомой. По степени поляризации флуоресценции определялась доля вытесненного флуоресцентного соединения, и, исходя из известной константы диссоциации для BODIPY-Ery, рассчитывалась эффективная константа диссоциации (далее просто константа диссоциации, K_d) комплексов производных эритромицина с рибосомой. Для этого была проведена серия экспериментов, в которой концентрация рибосом (17 нМ) и BODIPY-Ery (4 нМ) была постоянной, а концентрации анализируемых соединений варьировались от 1 нМ до 10 мкМ (рис. 3). На основании этих данных были вычислены K_d комплексов производных **IV** и **V**, а также исходных соединений **I** и **II** с рибосомой (таблица).



Путь синтеза альдегидсодержащих производных эритромицина А. *a* – I₂, CH₃COONa, MeOH/H₂O; *б* – BrCH₂CH(OEt)₂, DIPEA, 50°; *в* – BiNO₃ × 5H₂O, CH₂Cl₂; *z* – CH₃CH=CHCHO, 50°

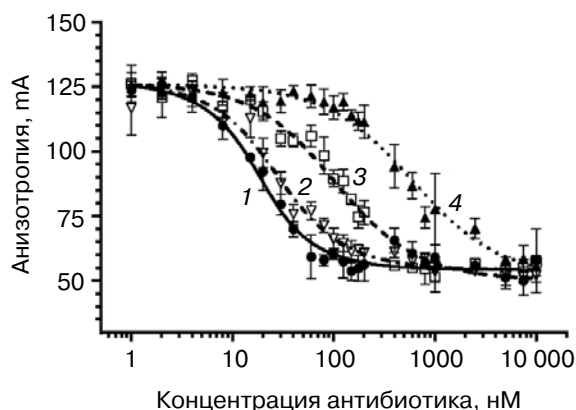


Рис. 3. Кривые вытеснения BODIPY-эритромицина из его комплекса с 70S рибосомами *E. coli* исследуемыми соединениями (1 – эритромицин А (I); 2 – 3'-N-(1-метил-3-оксопропил)-3'-N-дезметилэритромицин А (V); 3 – 3'-N-дезметилэритромицин А (II); 4 – 3'-N-(2-оксоэтил)-3'-N-дезметилэритромицин А (IV)) при постоянных концентрациях BODIPY-эритромицина (4 нМ) и рибосом (17 нМ). Для каждой точки приведено среднее значение ± s.d., рассчитанное из четырех повторных измерений

Как видно из таблицы, удаление одной метильной группы из молекулы эритромицина (I) снижает сродство антибиотика к рибосоме примерно на порядок (соединение II). Введение 2-оксоэтильного заместителя приводит к еще большему снижению аффинности (соединение IV). В то же время введение в соединении II 1-метил-3-оксопропильной группы (соединение V) увеличивает стабильность его комплекса с рибосомой в 6 раз, и она становится сравнимой с таковой для исходного эритромицина.

Таким образом, аффинность антибиотика к рибосоме достаточно чувствительна к любой модификации по 3'-N-группе, будь то удаление существующих или введение новых заместителей. Скорее всего, наблюдаемый эффект можно объяснить влиянием рассматриваемого участка структуры на образование ключевой для взаимодействия антибиотика с РТ водородной связи между 2'-ОН и N1 A2058, поскольку расстояние между 3'-N- и 2'-О-атомами составляет всего 2,9 Å. О важности этой связи говорит тот факт, что антибактериальная активность 2'-(дезоксид)-эритромицина ниже таковой эритромицина на 2 порядка [21].

Изучение способности антибиотиков ингибировать трансляцию *in vitro*. Измерение ингибирующей активности проводилось в бесклеточной системе трансляции мРНК фермента люциферазы *Renilla luciferase*. Различия в ингибирующей активности соединений проявляются наи-

Константы диссоциации комплексов производных эритромицина А с рибосомой

Соединение	K_d , нМ
I	$3,5 \pm 0,9$
II	44 ± 8
IV	280 ± 60
V	$8,1 \pm 1,2$

Примечание. Приведены средние значения ± s.d.

более отчетливо при концентрации антибиотика 1 мкМ (рис. 4).

Наблюдается качественная корреляция между сродством к рибосоме и способностью ингибировать биосинтез белка: снижение биологической активности в ряду I–V–II–IV соответствует такому же ряду понижения устойчивости комплексов этих веществ с рибосомой, при этом соединение V оказалось по ингибирующей способности примерно на уровне эритромицина.

Молекулярно-динамическое моделирование. Для объяснения различий в связывании 3'-N-модифицированных производных эритромицина А, содержащих альдегидную группу, было проведено молекулярно-динамическое моделирование соединений IV и V, а также исходного эритромицина (I) во фрагменте рибосомы, содержащем РТ. Молекулярная динамика не может описать перераспределение ковалентных связей в системе, однако она способна описать динамику реакционных центров, предшествующую образованию связи, и устойчивость их

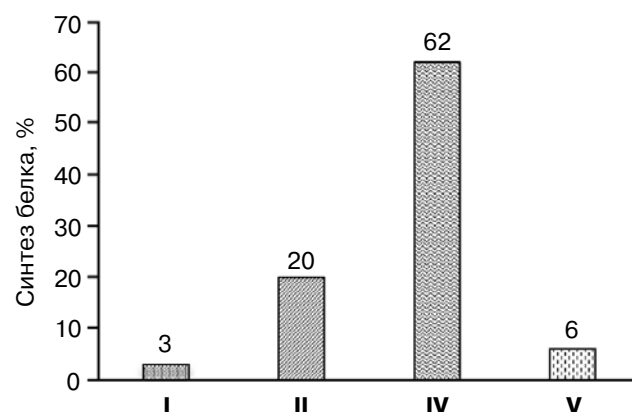


Рис. 4. Относительные величины подавления трансляции для соединений I, II, IV, V при их концентрации в системе 1 мкМ, время реакции – 60 мин

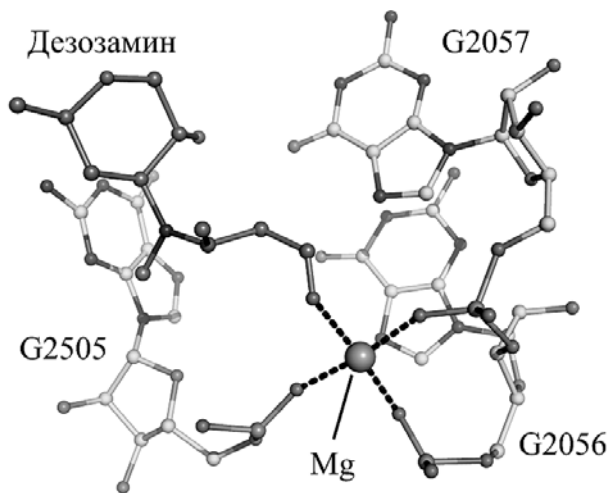


Рис. 5. Ион магния, координирующий альдегидную группу 3'-N-(1-метил-3-оксопропил)-3'-N-дезметилэритромицина А и фосфатные группы остатков G2056, G2057 и G2505. Показан только остаток дезоамина эритромицина

сближенного состояния. Кроме того, молекулярная динамика может предсказать образование водородной связи, исходя из геометрического положения потенциального донора и ак-

цептора, поэтому данный метод может помочь подтвердить или опровергнуть гипотезу о влиянии 3'-N заместителей на водородную связь 2'-ОН группы антибиотика с нуклеотидом A2058. Так, альдегидная группа 3'-N-(2-оксоэтил)-3'-N-дезметилэритромицина (IV) образует устойчивую водородную связь с аминогруппой A2059 со встречаемостью 84% на протяжении времени расчета. Это, казалось бы, говорит в пользу высокой вероятности образования ковалентной связи между упомянутыми выше группами, однако образование данной водородной связи удаляет дезоаминовый фрагмент от A2058, что приводит к потере ключевого для связывания эритромицина взаимодействия 2'-ОН-группы с этим нуклеотидом и дестабилизации всей структуры. Согласно полученным данным динамического моделирования, встречаемость связи 2'-ОН-группы дезоаминового остатка с N1 A2058 падает с 76% для эритромицина до 22% для соединения IV. Можно предположить, что новая связь альдегидного заместителя с A2059 конкурирует с прежними контактами дезоаминового фрагмента с A2058.

В случае соединения V водородная связь между 2'-ОН и N1 A2058 также практически от-

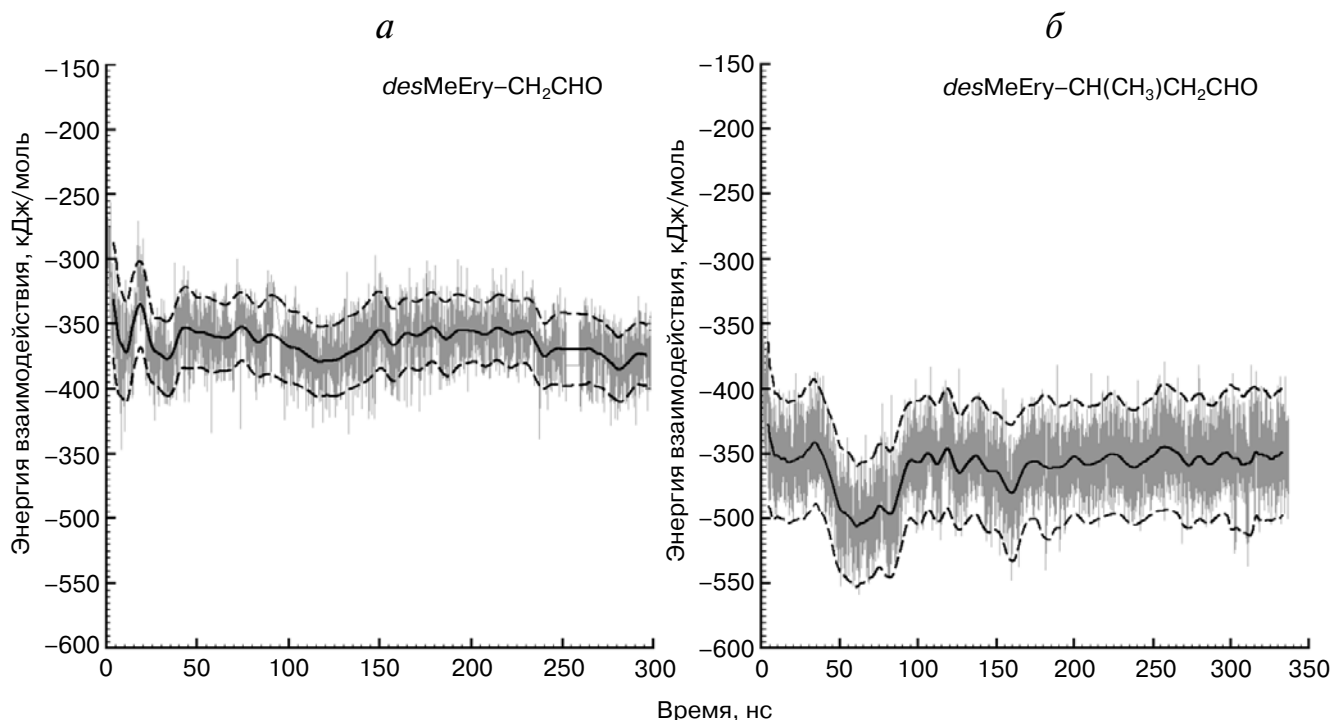


Рис. 6. Энергия невалентных взаимодействий антибиотиков с рибосомой согласно расчетам методом молекулярной динамики: слева – для соединения IV, справа – для соединения V. Серым показаны значения энергии невалентных взаимодействий, черной сплошной линией – значения энергии, сглаженные скользящим средним с окном 8 нс, черной пунктирной линией – скользящее стандартное отклонение

сутствует в траектории (встречаемость ~7%), но этот же гидроксил антибиотика образует новую стабильную водородную связь — с O6 G2057 (встречаемость 76%). Помимо этого альдегидная группа соединения V за счет большей длины углеводородной цепочки встраивается в координационную сферу одного из ионов Mg^{2+} , где также находятся фосфатные группы G2056, G2057 и G2505 (рис. 5).

Энергия координирования магнием альдегида, ~170 кДж/моль, сопоставима с энергией всех остальных невалентных взаимодействий данного соединения с рибосомой — порядка 280 кДж/моль. Сумма этих энергий — 450 кДж/моль — заметно превышает энергию невалентных взаимодействий соединения IV, не координируемого ионами магния, с рибосомой — 350–370 кДж/моль (рис. 6).

Результаты молекулярной динамики объясняют причину падения сродства к рибосоме соединения IV: как и предполагалось, нарушается критически важная связь 2'-ОН макролида с N1 A2058, правда, не из-за помех со стороны 3'-N-заместителя, а за счет смещения дезозаминового остатка из оптимального для образования этой связи положения.

При этом не наблюдавшиеся в траектории с исходным эритромицином взаимодействия в случае соединения V (новая водородная связь, а также координационная связь с Mg^{2+}) намного более прочные, чем в соединении IV (одна водородная связь). Высокую лабильность связывания этого производного с рибосомой можно объяснить конкуренцией между двумя примерно

равными водородными связями соединения IV с P1, что согласуется с экспериментальными данными. Судя по результатам молекулярно-динамического исследования, ковалентная связь между альдегидной группой полученного соединения и нуклеотидом 23S рРНК не образуется: карбонильный углерод в течение всей траектории находится в плоскости основания, в то время как полуаминаль образуется в результате атаки электрофильного центра неподеленной парой электронов атома азота перпендикулярно плоскости ароматического кольца. Иными словами, наблюдаемое взаимное расположение реакционных групп смещено на 90° относительно необходимой конфигурации.

Для соединения V, предположительно, реализуется модель связывания, включающая комбинацию координационного и водородного взаимодействий, которая по эффективности не превышает характерную для эритромицина и других макролидов, однако сравнима с ней. Поэтому такая модель может быть использована в качестве основы для получения новых соединений, способных связываться с рибосомами резистентных к эритромицину штаммов бактерий.

Авторы благодарят сотрудника химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова к.х.н. И.А. Остермана за помощь в проведении биологических испытаний *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sunazuka, T., Omura, S., Iwasaki, S., and Mura, S. (2002) *Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice*, 2nd ed., Elsevier Science, p. 100.
2. Bottger, E.C., Springer, B., Prammananan, T., Kidan, Y., and Sander, P. (2001) Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics, *EMBO Rep.*, **2**, 318–323.
3. Hansen, J., Ippolito, J.A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2002) The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit, *Mol. Cell*, **10**, 117–128.
4. Kirst, H.A., Toth, J.E., Debono, M., Willard, K.E., Truedell, B.A., Ott, J.L., Counter, F.T., Felty-Duckworth, A.M., and Pekarek, R.S. (1988) Synthesis and evaluation of tylosin-related macrolides modified at the aldehyde function: a new series of orally effective antibiotics, *J. Med. Chem.*, **31**, 1631–1641.
5. Starosta, A.L., Karpenko, V.V., Shishkina, A.V., Micolajka, A., Sumbatyan, N.V., Schlunzen, F., Korshunova, G.A., Bogdanov, A.A., and Wilson, D.N. (2010) Interplay between the ribosomal tunnel, nascent chain, and macrolides influences drug inhibition, *Chem. Biol.*, **17**, 504–514.
6. Freiberg, L.A. (1973) Process for the demethylation of 3-aminomacrolides, US Patent 3725385.
7. Noll, M., Hapke, B., and Noll, H. (1973) Structural dynamics of bacterial ribosomes, II. Preparation and characterization of ribosomes and subunits in the translation of natural messenger RNA, *J. Mol. Biol.*, **80**, 519–529.
8. Yan, K., Hunt, E., Berge, J., May, E., Copeland, R.A., and Gontarek, R.R. (2005) Fluorescence polarization method to characterize macrolide-ribosome interactions, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 3367–3372.
9. Wang, Z.X. (1995) An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule, *FEBS Lett.*, **360**, 111–114.
10. Svetlov, M.S., Kommer, A., Kolb, V.A., and Spirin, A.S. (2006) Effective cotranslational folding of firefly luciferase without chaperones of the Hsp70 family, *Protein Sci.*, **15**, 242–247.
11. Jack, A., Dunkle, J.A., Xiong, L., Mankin, A.S., and Cate, J.H.D. (2010) Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 17152–17157.
12. 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.

13. Hess, B., 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.
14. Bussi, G., Donadio, D., and Parrinello, M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling, *J. Chem. Phys.*, **126**, doi: 10.1063/1.2408420.
15. Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W.F., DiNola, A., and Haak, J.R. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.*, **81**, 3684–3690.
16. 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**, 10089–10092.
17. Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., and Madura, J.D. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.*, **79**, 926–935.
18. Athavale, S.S., Petrov, A.S., Hsiao, C., Watkins, D., Prickett, C.D., Gossett, J.J., Lie, L., Bowman, J.C., O'Neill, E., Bernier, C.R., Hud, N.V., Wartell, R.M., Harvey, S.C., and Williams, L.D. (2012) RNA-folding and catalysis mediated by Iron (II), *PLoS One*, **7**, e38024.
19. Clark, R.F., Ma, Z., Wang, S., Griesgraber, G., Tufano, M., Yong, H., Li, L., Zhang, X., Nilius, A.M., Chu, D.T.W., and Or, Y.S. (2000) Synthesis and antibacterial activity of novel 6-O-substituted erythromycin A derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 815–819.
20. Eash, K.J., Pulia, M.S., Wieland, L.C., and Mohan, R.S. (2000) A simple chemoselective method for the deprotection of acetals and ketals using bismuth nitrate pentahydrate, *J. Org. Chem.*, **65**, 8399–8401.
21. LeTourneau, N., Vimal, P., Klepacki, D., Mankin, A., and Melman, A. (2012) Synthesis and antibacterial activity of desosamine-modified macrolide derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 4575–4578.

DERIVATIVES WITH RIBOSOMES

**A. V. Shishkina¹, T. M. Makarova², A. G. Tereshchenkov²,
G. I. Makarov², G. A. Korshunova^{1*}, A. A. Bogdanov¹**

¹ *A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991,
Russia; E-mail: korsh@genebee.msu.ru*

² *M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry,
Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-3181*

Received July 6, 2015

Revision received July 24, 2015

A method of molecular static simulation was used to design erythromycin analogs containing an aldehyde group in place of the methyl substituent in position 3'-N that can form a covalent bond with an amino group of 23S r RNA nucleotide. An analogous interaction is usual for tylosin-related antibiotics that are strongly associated with the large ribosome subunit and have high antibacterial activity. The binding of the new erythromycin derivatives with the bacterial ribosome were examined by a fluorescence polarization method. The best binding was shown for the analog bearing 1-methyl-3-oxopropyl group at the 3'-N. Its inhibitory activity is comparable to that of erythromycin and vastly superior to desmethylerythromycin. Molecular dynamics simulation of ribosome–antibiotic complexes was performed to explain these data.

Key words: ribosomal tunnel, macrolides, erythromycin, modeling