

На правах рукописи



МАКАРОВА Татьяна Михайловна

**ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ
ЯВЛЕНИЙ
В БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОСОМЕ
МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОГО
МОДЕЛИРОВАНИЯ**

Специальность 02.00.10 — биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Москва 2020

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений химического факультета
Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования
“Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова”.

**Научный
руководитель:**

Богданов Алексей Алексеевич,
доктор химических наук, профессор, академик РАН

**Официальные
оппоненты:**

Малыгин Алексей Аркадьевич,
доктор химических наук, доцент, Институт химической
биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Миронов Андрей Александрович,
доктор биологических наук, профессор, факультет
биоинженерии и биоинформатики Московского
Государственного Университета им. М.В. Ломоносова

Никулин Алексей Донатович,
доктор химических наук, заместитель директора Института
белка Российской академии наук, Пущино

Защита состоится 28 апреля 2020 г. в 16⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета
МГУ.02.03 Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова по адресу:
119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 40, лабораторный корпус “А”, аудитория
501.

E-mail: makarovatm@susu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ло-
моносова и на сайте на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/284164400/>

Автореферат разослан « » марта 2020 года.

Учёный секретарь диссертационного
совета, кандидат химических наук, доцент



Смирнова И.Г.

Общая характеристика работы

Актуальность работы

Рибосома в современном представлении есть молекулярная машина, которая через последовательную смену состояний синтезирует все клеточные белки согласно нуклеотидной последовательности матричной РНК (мРНК). Переходы рибосомы между различными конформационными состояниями в ходе этого процесса осуществляются через скоординированные изменения структуры самой рибосомы и связанных с ней лигандов — транспортных РНК (тРНК), матричной РНК (мРНК) факторов трансляции, вновь синтезируемых пептидов в рибосомном туннеле (РТ). На определенные стадии этого процесса могут также влиять малые эффекторы, антибиотики, а также мутации или модификации нуклеотидных остатков рРНК, которые зачастую действуют аллостерически. Существует множество экспериментальных свидетельств того, что функциональные центры рибосомы регулируются из участков, удаленных на десятки ангстрем и иногда находящихся в другой молекуле или даже субъединице комплекса, то есть аллостерически.

Чтобы вникнуть в детали, лежащие в основе работы рибосомы, необходимо получить динамическую картину процесса трансляции на уровне отдельных остатков рибосомных РНК (рРНК) и белков и их нековалентных взаимодействий. Существующие экспериментальные методы предоставляют полезную и достаточно сложную картину связности тех или иных остатков на определенных стадиях работы рибосомы, тем не менее оставляя неясными структурные основы наблюдаемых явлений. При этом структурные методы исследования рибосомы — рентгеноструктурный анализ и криоэлектронная микроскопия — при анализе комплекса с молекулярной массой 2,5MD позволяют получить, как правило, усредненную и статичную структуру определенных состояний комплекса, зафиксированную при температурах жидкого азота. Этого далеко не достаточно, чтобы понять природу аллостерической регуляции работы рибосомы, поскольку этот тип регуляции подразумевает, что тот или иной макромолекулярный комплекс имеет несколько конформационных состояний, находящихся в динамическом равновесии, что и обеспечивает его изменчивость и восприимчивость к внешним сигналам.

Существующие проблемы на данном этапе способен в известной мере разрешить метод молекулярно-динамического моделирования (МД), способный *in silico* описать внутримолекулярную подвижность биополимеров в растворе при заданной

температуре. В последние годы этот метод стали неоднократно применять к такому сложному объекту, как рибосома. При этом были получены многообещающие результаты.

Транспортные РНК (тРНК), осуществляющие доставку аминокислот в пептидилтрансферазный центр (ПТЦ) для пептидилтрансферазной реакции (ПТР), в ходе выполнения своей функции последовательно занимают три канонических сайта рибосомы: А– (aminocyl), Р– (peptidyl) и Е– (exit) сайты. В А–сайте аминоацилированная тРНК (aa–тРНК) связывается непосредственно перед ПТР, в ходе которой вновь синтезированный пептид с Р–тРНК переместится на аминогруппу вновь привнесенного аминокислотного остатка на А–тРНК. В Е–сайт доставляется деацилированная тРНК из Р–сайта с тем, чтобы после этого покинуть рибосому.

Достоверно известно, что связывание тРНК в А–сайте подвергается аллостерическому воздействию эффекторов, связывающихся в самых разных функциональных участках рибосомы: это и тРНК в Е–сайте, и мутации в 23S рРНК бактериальной рибосомы, и, с высокой долей вероятности, пептиды и антибиотики, связывающиеся в РТ.

Степень разработанности проблемы

К настоящему моменту есть свидетельства того, что А– и Е–тРНК являются антагонистами, что проявляется особенно четко на первых циклах элонгации. Механизм передачи аллостерического сигнала, обеспечивающего этот антагонизм до сих пор не ясен.

Ровно так же остается непонятным механизм многократно наблюдавшегося в различных экспериментах явления остановки пептидилтрансферазной реакции (ПТР), хотя есть обоснованные предположения, что он связан с изменением способности А–сайта к связыванию тех или иных аминоацил–тРНК (aa–тРНК).

Цели и задачи работы

Целью настоящей работы было полноатомное молекулярно-динамическое моделирование 70S рибосомы *E. coli* в различных функциональных состояниях, чтобы ответить на ряд фундаментальных вопросов о механизме ее функционирования. Для осуществления этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Отработать протокол подготовки системы 70S рибосомы *E. coli* для молекулярно-динамического моделирования

2. Смоделировать поведение рибосомы в растворе при 310K в ее аллостерически антагонистичных состояниях: во-первых, связавшей тРНК в А/А- и Р/Р-сайтах (именуемое далее как АР-состояние), во-вторых, содержащей тРНК в Р/Р- и Е/Е-сайтах (здесь и далее — РЕ-состояние)
3. Выявить основные различия в нековалентных взаимодействиях остатков РНК между описанными состояниями и предложить на основании этого механизм передачи аллостерического сигнала
4. Изучить влияние пептида в рибосомном туннеле (РТ) на состояние Е-тРНК в молекулярно-динамической модели
5. Изучить влияние мутаций A2531U и UU2492-3C — аллостерических ингибиторов связывания А-тРНК — на систему в АР-состоянии и получить из этого общее представление о механизме инактивации А-сайта
6. Смоделировать комплексы рибосомы в АР-состоянии, содержащие антибиотики, связывающиеся в РТ с целью выявить механизм их воздействия на А-сайт и ПТЦ

Объект исследования — молекулярно-динамическая модель 70S рибосомы *E. coli*.

Предмет исследования — конформационный и аллостерический ответ 70S рибосомы *E. coli* на связывание различных лигандов и определенные мутации в 23S рРНК.

Научная новизна

Данная диссертационная работа, посвященная молекулярно-динамическому моделированию 70S рибосомы *E. coli*, представляет собой оригинальное научное исследование. В ходе её выполнения впервые был разработан протокол предварительной оптимизации системы, позволяющий наблюдать воспроизводимые эффекты перераспределений нековалентных взаимодействий внутри целой рибосомы при воздействии тех или иных лигандов. Благодаря этому впервые было обнаружено взаимодействие А- и Е-сайтов большой субъединицы рибосомы через спираль H93. Аналогично впервые было показано участие в аллостерической связи с А-сайтом межсубъединичных мостов В7а, В2а/d и В3. Впервые показано, что сайт связывания

C75 E–тРНК по результатам анализа траекторий молекулярной динамики оказался основным фактором воздействия на А–сайт.

Новизной отличаются и данные, полученные относительно А–сайта большой субъединицы рибосомы: МД-моделирование впервые позволило обнаружить его “закрытую” конформацию, стерически противоречащую связыванию в ней тРНК. Эту конформацию сайт занимает в РЕ–состоянии, значительно в ее сторону он смещается при мутациях A2531U и UU2492-3C, известных своей способностью препятствовать связыванию А–тРНК.

Наконец, это же переключение А–сайта было обнаружено и при связывании в рибосомном туннеле антибиотиков хлорамфеникола и эритромицина.

Теоретическая значимость работы

Было продемонстрировано, что характер аллостерических взаимосвязей в крупных молекулах РНК осуществляется, главным образом, через перераспределение нековалентных взаимодействий остатков с повышенной конформационной вариабельностью вне стабильных двуспиральных структур.

Это следует учитывать при дальнейшем моделировании аллостерических явлений в системах, содержащих РНК.

Практическая значимость работы

Переключения А–сайта, обнаруженные в ходе данной работы, носят универсальный характер и обеспечивают способность рибосомы останавливать пептидилтрансферазную реакцию самыми разнообразными аллостерическими эффекторами.

Поэтому полученные в данной работе результаты следует учитывать при дизайне новых антибиотиков, нацеленных на подавление пептидилтрансферазной активности бактериальных рибосом.

Методология диссертационного исследования

При проведении вычислительных экспериментов использовался метод молекулярно-динамического моделирования с помощью пакета GROMACS 5.1.4 и силового поля AMBER-ff14SB. Топологии для антибиотиков эритромицина хлорамфеникола были получены в силовом поле GAFF. Оптимизация геометрии и молекулярных электростатических потенциалов вновь параметризуемых остатков и молекул получались квантово-химическими расчетами методом Хартри-Фока с базисом 6-31G* в пакетах FIREFLY и ПРИРОДА.

Для первоначальной оценки положения вновь введенных лигандов (пептидов, хлорамфеникола) использовался метод докинга с помощью программы rDock на фрагменте рибосомы.

Анализ полученных траекторий осуществлялся как встроенными опциями пакета GROMACS, так и с помощью самостоятельно написанных программ на Python 2.7.

Личный вклад автора

Все вычислительные эксперименты выполнены лично автором. Оформление и обсуждение полученных результатов также выполнены лично автором.

Положения, выносимые на защиту

1. Построенная в данной работе молекулярно-динамическая модель хорошо согласуется с известными экспериментальными данными.
2. Антагонизм между А- и Е-сайтами большой субъединицы рибосомы осуществляется, главным образом, через воздействие, передающееся от С75 Е-тРНК на Н93, имеющую связи как с ПТЦ, так и с А-спиралью.
3. А-сайт большой субъединицы рибосомы может находиться в одной из двух конформаций: “открытой” с выпетливанием $\Psi 2580$ по направлению к РТ или “закрытой”, в которой стэкинг-взаимодействия между G2553-U2554-U2555 препятствуют связыванию тРНК.
4. Конформации межсубъединичных мостов В7а, В2а/d и В3 связаны с состоянием А-сайта, благодаря чему они участвуют в регуляции связывания с этим сайтом тРНК.
5. Переключение А-сайта между обнаруженными “открытой” и “закрытой” конформациями имеет универсальный характер, и, скорее всего, играет ключевую роль в остановке ПТР различными аллостерическими регуляторами.

Апробация работы

Результаты работы докладывались на 5 конгрессах и конференциях: The IX International Conference for Young Chemists “Mendeleev 2017” (Санкт-Петербург, Россия, 2015), International School-Seminar on Computer-Aided Molecular Design — устное сообщение (Казань, Россия, 2016), The X International Conference for Young Chemists

“Mendeleev 2017” (Санкт-Петербург, Россия, 2017), Molecular Simulation Studies in Material and Biological Sciences 2017, (Петергоф, Россия, Россия, 2017), 43th Congress of the Federation of European Biochemical Societies FEBS — устное сообщение (Прага, Чехия, 2018).

Публикации

Основные результаты диссертационной работы представлены в 5 публикациях в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science и Scopus.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на **125**-ти страницах машинописного текста и содержит **33** рисунка и **10** таблиц. Изложение работы включает в себя следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Результаты и их обсуждение, Методы, Выводы и Список литературы, содержащий **173** наименования.

Основное содержание работы

Конформация А–сайта большой субъединицы рибосомы при связывании тРНК в А– и Е–сайтах

На первом этапе исследования были получены молекулярно-динамические модели рибосомы во взаимно антагонистичных состояниях, а именно:

- РЕ — комплекс рибосомы с fMet–P–тРНК^{fMet} и деацилированной Е–тРНК^{fMet}
- AP — комплекс рибосомы с Ala–А–тРНК^{Phe} и fMet–P–тРНК^{fMet}

Сокращенные названия “AP” и “РЕ” будут здесь и далее применяться как для обозначения моделируемых систем с соответствующими тРНК, так и для состояний рибосомы, по ходу элонгационного цикла связывающей тРНК в указанных позициях.

Для этих систем было рассчитано по 4 траектории по длиной 200 нс каждая. Дрейф системы по поверхности потенциальной энергии заканчивался для этих систем примерно к 100 нс расчета. Поэтому для анализа взаимодействий между отдельными остатками рРНК использовались последние 100 нс интервалы каждой из траекторий.

В получившихся стабильных участках траекторий в первую очередь были исследованы взаимодействия между остатками РНК и аминокислот — это водородные

Таблица 1. Встречаемости нековалентных взаимодействий в моделировании МД для АР и РЕ систем. **АР (МД1)** и **РЕ (МД1)** — первое моделирование систем с рибосомой в АР и РЕ состоянии, соответственно; **АР (МД2)** и **РЕ (МД2)** — моделирование систем, полученные из результатов предыдущего расчета после дополнительной оптимизации. Значения рассчитаны по 4-х независимым траекториям для каждой системы и представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение.

Взаимодействие	АР (МД1)	АР (МД2)	РЕ (МД1)	РЕ (МД2)
А-сайт				
U2554 U2555	11 $\pm$ 19	7 $\pm$ 14	86 $\pm$ 2	68 $\pm$ 28
G2553 U2554	4 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	93 $\pm$ 7	96 $\pm$ 3
(A-tRNA)C74 U2555	98 $\pm$ 1	87 $\pm$ 23	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
(A-tRNA)C75/N4-H...G2553/O6	95 $\pm$ 2	92 $\pm$ 4	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
G2553/N2-H...(A-tRNA)C75/O2	87 $\pm$ 15	81 $\pm$ 17	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
(A-tRNA)C74/N4-H...U2554/O2	70 $\pm$ 47	95 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
U1944 U1955	86 $\pm$ 19	86 $\pm$ 10	25 $\pm$ 29	29 $\pm$ 34
G2557/N2-H...U1944/O4	67 $\pm$ 54	72 $\pm$ 48	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Ψ 2580 и его окружение				
Ψ 2580/N1-H...G2582/O6	35 $\pm$ 15	32 $\pm$ 23	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Ψ 2580/N3-H...G2576/N7	35 $\pm$ 18	45 $\pm$ 23	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Ψ 2580/N3-H...G2508/O6	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	70 $\pm$ 26	86 $\pm$ 15
G2508/N1-H... Ψ 2580/O4	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	92 $\pm$ 5	98.3 $\pm$ 0.7
G2505/N2-H...C2610/N3	2 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0	33 $\pm$ 21	33 $\pm$ 26
G2505/N1-H...C2610/O2	0 $\pm$ 0	0.8 $\pm$ 1.5	23 $\pm$ 18	28 $\pm$ 39
G2505/N2-H...G2581/O6	32 $\pm$ 23	53 $\pm$ 20	4 $\pm$ 4	9 $\pm$ 13
H93 и ее окружение				
C1941 C1965	99.0 $\pm$ 0.9	98.7 $\pm$ 0.5	0 $\pm$ 0	3 $\pm$ 7
C1941 C1942	80 $\pm$ 15	89 $\pm$ 7	0.5 $\pm$ 0.6	0.1 $\pm$ 0.2
C2591 G2592	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	89 $\pm$ 10	66 $\pm$ 45
C2591/N4-H...G2603/O6	1 $\pm$ 3	1 $\pm$ 2	99 $\pm$ 1	94 $\pm$ 12
G2603/N2-H...C2591/O2	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	99 $\pm$ 1	95 $\pm$ 5

связи и стэкинг-взаимодействия плоских ароматических групп. Наличие этих взаимодействий в траектории определялось исходя из геометрических параметров участвующих в них групп.

ССА-конец А-тРНК удерживается в рибосоме вершиной H92 23S рРНК, иначе именуемой А-спиралью: 3'-концевая стопка остатков ССА тРНК встраивается в единую стопку со всей А-спиралью через стэкинг-взаимодействие с U2555 (рис. 1). При этом основания G2553 и U2554 удерживают водородными связями C75 и C74 тРНК, соответственно (см. табл. 1).

В случае же РЕ-состояния А-спираль находится в конформации, стерически исключающей связывание ССА-конца тРНК в А-сайте. Во-первых, в РЕ-состоянии вершина А-спирали из остатков 2553-2556 23S рРНК образует сплошную стопку оснований (рис. 1, В). Кроме того, стерическое противоречие возникло бы еще и с нуклеотидом G2583. И если смещение остатков 2583-2584 под действием А-тРНК уже

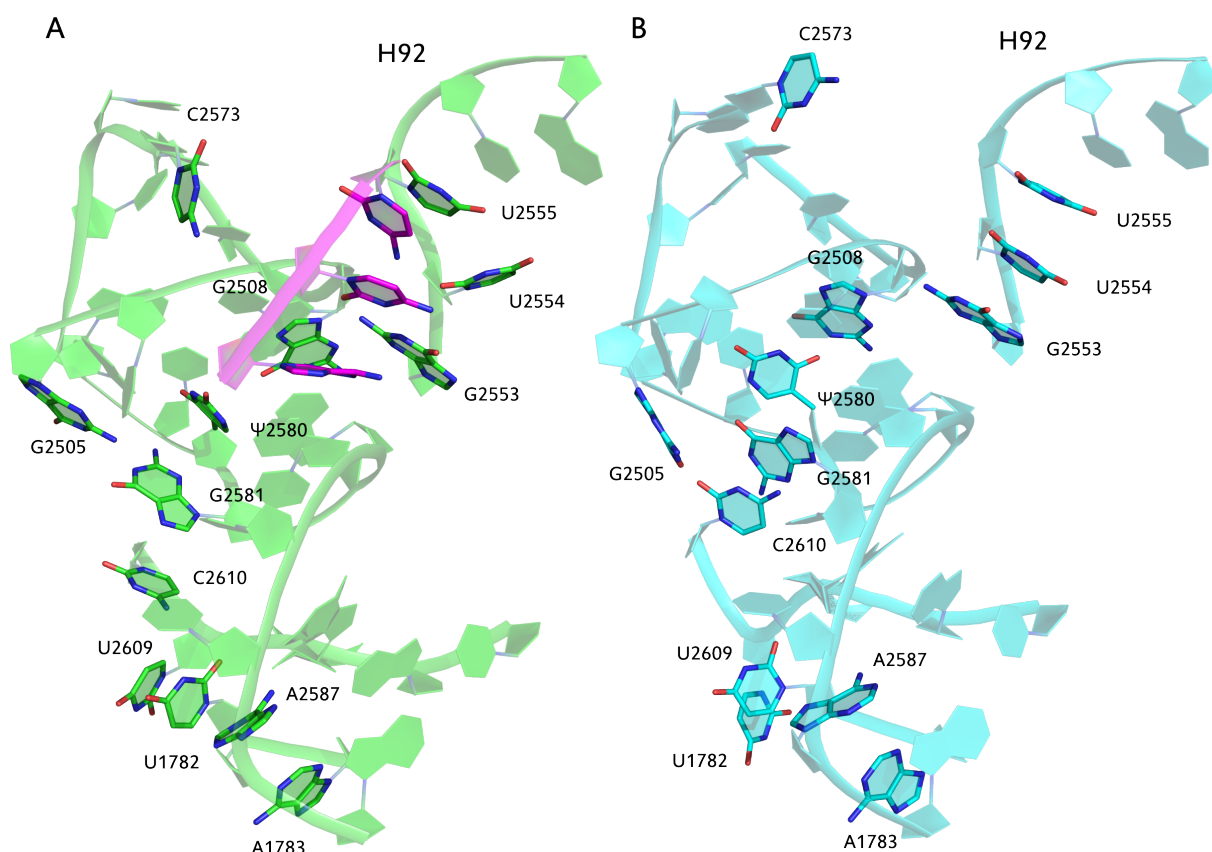


Рис. 1. Воздействие 3'-конца тРНК (выделен лиловым цветом) на А-сайт большой субъединицы рибосомы при связывании с ним. Изображены наиболее заселенные кластеры объединенных стабилизировавшихся участков траекторий молекулярной динамики (последние 100 из 200 нс каждой из 4 траекторий). **А.** AP-состояние. **В.** PE-состояние.

отмечалось ранее при анализе структурных данных, то образование "закрытой" для ССА-конца тРНК в конформации PE-состояния — это то, что было обнаружено только молекулярно-динамическим моделированием.

Смещение остатков 2583-2584 приводит к развороту плоскости основания G2581, которое формирует стэкинг-взаимодействия как с соседним остатком Ψ2580, так и с C2610, выходящим в просвет рибосомного туннеля (РТ). Это приводит к перераспределению нековалентных взаимодействий в этой области. В частности, связывание А-тРНК выворачивает Ψ2580 из внутриспирального положения по направлению к РТ, где он формирует водородную связь с G2576, в то время как в PE-состоянии он находится в паре с G2508 в составе своей спирали (рис. 1, А и В). Также в результате этого смещения меняются связи азотистого основания G2505.

Кроме того, разворачивается пара оснований U2609 и U1782, находящихся друг с другом в стэкинг-взаимодействии, так, что они становятся связующим "мостом" между G2581-Ψ2580-C2610 и вершиной спирали H93. Остатки C2610, U2609, U1782 и

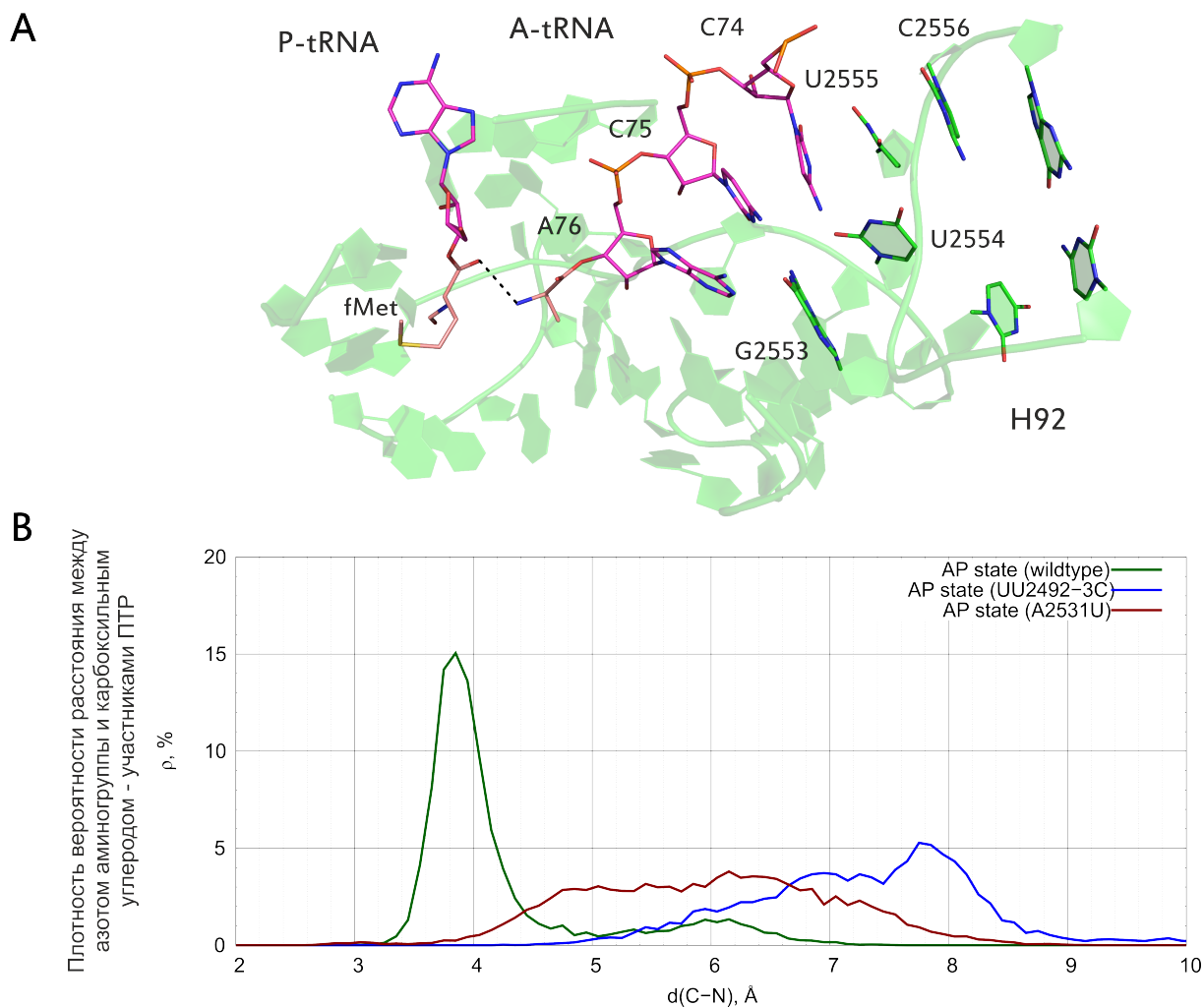


Рис. 2. А. Аминоацильный и пептидильный фрагмент в ПТЦ в АР-состоянии рибосомы. Водородная связь, наблюдаемая при моделировании МД между потенциальными участниками ПТР, отмечена пунктиром. Изображены наиболее заселенные кластеры объединенных стабилизировавшихся участков траекторий молекулярной динамики (последние 100 из 200 нс каждой из 4 траекторий). **В.** Плотность вероятности встречаемости определенной величины расстояния между атомами потенциальной новой пептидной связи в ПТЦ, согласно данным моделирования МД рибосомы в АР-состоянии, а также рибосомы с А- и Р-тРНК, содержащей мутацию А2531U или UU2492-3C.

А2587 из Н93 известны как участники передачи сигнала из РТ в ПТЦ при связывании антибиотика в РТ и его взаимодействии с растущей пептидной цепью.

С противоположной стороны вершины А-спирали был обнаружен еще один любопытный конформационный переход, обеспечиваемый основаниями U1944 и U1955, выпетливающимися из Н71. В АР-состоянии они находятся в стэкинг-взаимодействии друг с другом, и U1944 формирует водородную связь с G2557. В РЕ-состоянии U1944 предпочитает образовывать стэкинг-контакт с изменившим свое положение G2557 вместо прежнего контакта с U1955.

Полученные АР и РЕ состояния были проверены на стабильность: из объединенных

траекторий были извлечены кадры, наиболее близкие к центру наиболее населённого кластера остатков рРНК в ПТЦ и верхней части РТ; исходя из них были также рассчитаны по четыре 200 нс траектории. В новых траекториях потенциальная энергия, в ходе эволюции системы менялась слабо, что говорит о достижении системой минимума на суперповерхности потенциальной энергии. В новых полученных траекториях также сохранялись все взаимодействия остатков рРНК в ядре рибосомы — ПТЦ и верхней части РТ — ровно как в аллостерических путях, которые мы будем обсуждать ниже (табл. 1).

Связывание тРНК в Е-сайте 50S субъединицы рибосомы

Е-тРНК связывается с большой субъединицей рибосомы в РЕ-состоянии одновременно в нескольких локусах (рис. 3).

Наиболее важным аллостерическим эффектором оказался сайт связывания С75: стопка четырех универсально консервативных аденинов — остатков A2432, A2433, A199 и A2424, связанная с еще одним универсально консервативным элементом — переходом между спиралями H74 и H75, куда также примыкает вершина H93.

Кроме того, антикодоновая петля Е-тРНК через мРНК воздействует на прилежащую спираль h23 и стабилизирует ее. Эта спираль с противоположного от мРНК конца образует межсубъединичный мост В7а: A702 h23 16S рРНК формирует стэкинг-взаимодействие с A1848 23S рРНК. Этот мост при моделировании молекулярной динамики стабилен исключительно в РЕ-состоянии. В AP-состоянии обрзующие его межсубъединичные связи полностью расходятся, A1847 закрывается стэкинг-взаимодействием с A1848.

Кроме того, некоторые перегруппировки взаимодействий происходят и в межсубъединичных мостах В2а/d и В3, которые находятся довольно близко к области связывания А-тРНК в близком контакте с А-спиралью по графу нековалентных взаимодействий.

Многие из наблюдаемых в МД-моделировании явлений нашли свое подтверждение в ранее известных экспериментальных фактах:

- для Ψ2580 — снижением частоты ПТР на порядок мутацией Ψ2580С, при которой невозможна стабилизация выпетленного состояния нуклеотида соответствующими водородными связями;

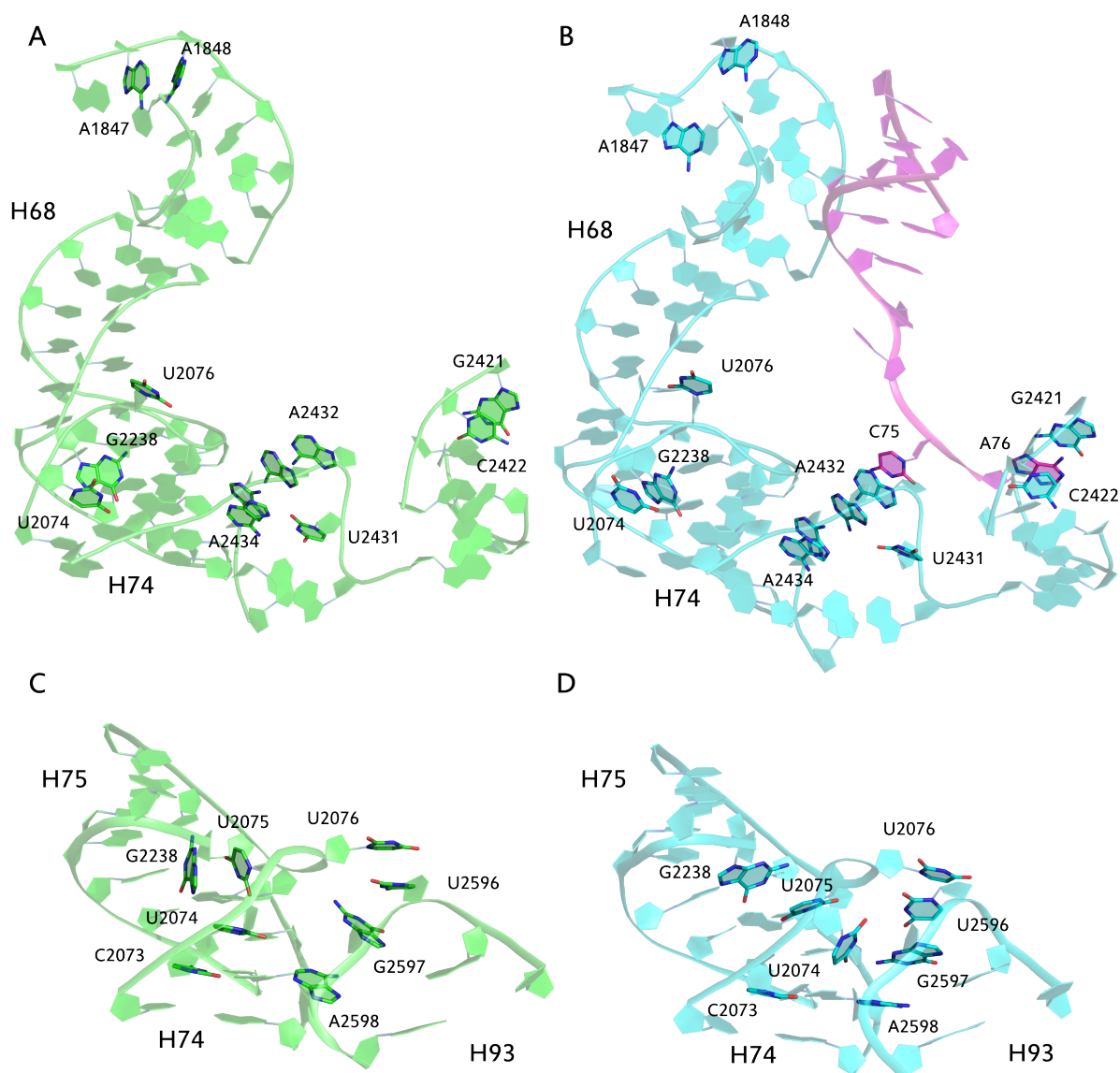


Рис. 3. Воздействие акцепторного стебля тРНК (выделен лиловым цветом) на Е-сайт большой субъединицы рибосомы при связывании с ним. Изображены наиболее заселенные кластеры объединенных стабилизировавшихся участков траекторий молекулярной динамики (последние 100 из 200 нс каждой из 4 траекторий). **А.** AP-состояние. **В.** PE-состояние. **С.** AP-состояние, район соединения H74, H75 и H93. **Д.** PE-состояние, район соединения H74, H75 и H93.

- для межсубъединичного моста В7а — экранированием нуклеотидов, образующих этот мост, от 2'-ацилирования при наличии тРНК в каноническом Е/Е-сайте;
- для H93 — различием в профиле модификаций нуклеотидов, участвующих в перераспределении связей, между AP- и PE-состояниями;
- для U1944 — согласованной с G2557 заменой нуклеотида при переходе от прокариотической к эукариотической рибосоме, что говорит о функциональной важности связи между этими остатками.

Взаимодействие А– и Е– сайтов рибосомы

Изучение полного графа взаимодействий между остатками рРНК, а также конформационных различий на путях в этом графе позволило найти наиболее вероятного кандидата на роль передающего аллостерический сигнал элемента — это спираль Н93, связующая сайт прикрепления С75 Е–тРНК и А–спираль.

Как уже было сказано, С75 Е–тРНК значительно искажает структуру на стыке между спиралями Н74, Н75 и Н93 через стопку универсально консервативных содержащих адениновые основания нуклеотидов А2432-А199-А2433-А2434. В результате, U2074 выходит из спиральной структуры Н74/Н75 и образует пару с G2597 из вершины Н93. При этом стопка из пары оснований, G2238 и U2075, из состояния, перпендикулярного плоскостям стебля Н74/Н75, разворачивается в компланарное им.

Вследствие этого у спирали Н93 сильно отличается конформация в различных состояниях рибосомы: в АР состоянии она несколько надломлена в центре (нарушается стэкинг-взаимодействие между G2592 и C2591 и некоторые внутренние водородные связи спирали), в РЕ этого надлома нет. От этой спирали отходят различные короткие стопки внеспиральных оснований, причем в различных состояниях Н93 поддерживает связь с разными из них. Так, универсально консервативная стопка А1966-С1965-С1941-С1942-U1943, ведущая к Н71, связана с Н93 (и вообще связна) только в АР–состоянии, в РЕ–состоянии она разобщена в районе С1941. Напротив, только в РЕ–состоянии поддерживает стэкинг-взаимодействия с А1786 из вершины Н65. (рис. 4 и табл. 2)).

Пара оснований U1944 и U1955, формирующих стабильное лишь в АР–состоянии стэкинг-взаимодействие, также выпетливаются из Н71. Положение U1944 значительно изменяется при расхождении стопки А1966-С1965-С1941-С1942-U1943. В АР–положении U1944 вступил бы в стерический конфликт с остатками 2556-2557 23S рРНК из РЕ–структуры.

Интересно и то, что универсально консервативное основание А2602, находящееся между ССА–концами А– и Р–тРНК в ПТЦ и выпетливающееся из Н93, в РЕ–состоянии смещается так, что он слабо взаимодействует с G2553, заграждая эту позицию для С75 А–тРНК.

Помимо Н93, прослеживается и “второй контур” этой системы передачи конформационных изменений: это спирали Н68-71, которые, кроме Н69, ответвляющейся к мосту В2а/d, соединяют общим извилистым стеблем Н75, мост В7а, короткие перемычки из стопок оснований, отходящих от Н93, и, наконец А–спираль.

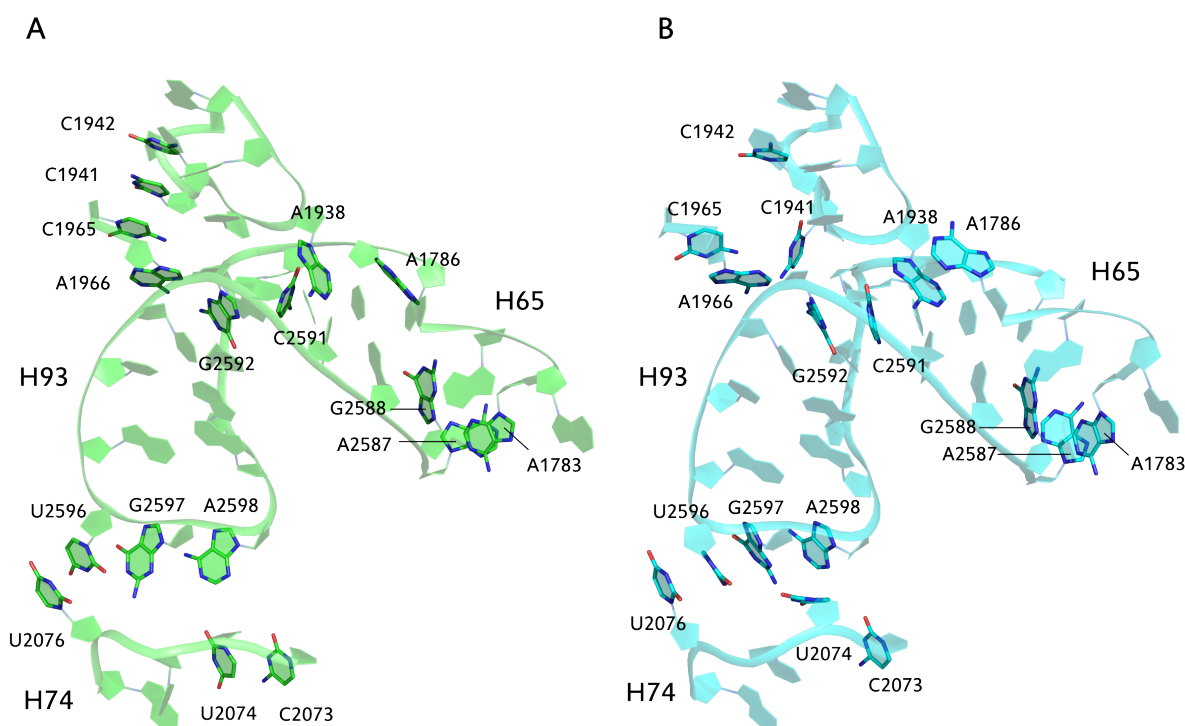


Рис. 4. Различия в конформации и внешних связях спирали H93, напрямую соединяющей сайт связывания С75 Е-тРНК и ПТЦ, наблюдаемые в молекулярно-динамическом моделировании AP- и PE-состояний рибосомы. Изображены наиболее заселенные кластеры объединенных стабилизировавшихся участков траекторий молекулярной динамики (последние 100 из 200 нс каждой из 4 траекторий). **А.** AP-состояние. **В.** PE-состояние.

Этот стебель напрямую соединяет мосты В7а и В2а/d. Внедрение А702 16S рРНК в Н68 требует выпадения основания А1847 из спирали Н68, что сдвигает весь стебель Н68 по направлению от А-сайта примерно на 1Å. При этом стопка оснований G1839-А1927-А1928-G1929, соединяющая спирали Н68 и Н69, оказывается разорванной. Напротив, в AP-состоянии, связывание А-тРНК прижимает Н69 к Н68, чем уплотняет структуру последней, вынуждая А1847 находиться в стэкинге с А1848 и тем самым не оставляя места для внедрения А702 16S рРНК.

Наиболее полно перегруппировки нековалентных взаимодействий в “аллостерическом ядре” перечислены в табл. 3.

Через малую субъединицу стопка остатков 1517-1519 h45 16S рРНК “врезается” в район h44 посредством стэкинг-взаимодействия m⁶₂А1519 и А1499; в PE-состоянии связи в этой области h44 оказываются нетронуты, а G1517 скрепляет собой спирали h24 и h44 через образование водородных связей с G791 и G1496, соответственно.

Спираль h44, отходящая от В2а/d образует мост В3 с Н71 23S рРНК. Здесь, на этом мосту, замыкаются пути, о которых говорили выше, регулирующие конформацию А-спирали. Так, в AP-состоянии, когда поддерживающая мост спираль

Таблица 2. Встречаемость нековалентных взаимодействий в районе спиралей Н93 и Н71 23S рРНК, полученные по результатам молекулярно-динамического моделирования. Значения рассчитаны по 4-х независимым траекториям для каждой системы и представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение.

Внутренняя структура Н93						
U2593 C2594	14 $\pm$ 5	54 $\pm$ 10	39 $\pm$ 36	37 $\pm$ 24	79 $\pm$ 5	61 $\pm$ 3
C2601 G2603	97 $\pm$ 2	18 $\pm$ 20	40 $\pm$ 40	81 $\pm$ 28	79 $\pm$ 36	28 $\pm$ 10
G2603/N2-Н...C2591/O2	0 $\pm$ 0	66 $\pm$ 57	98.5 $\pm$ 0.8	62 $\pm$ 45	46 $\pm$ 54	95 $\pm$ 5
C2591/N4-Н...G2603/O6	1 $\pm$ 2	64 $\pm$ 56	94 $\pm$ 5	51 $\pm$ 36	41 $\pm$ 47	94 $\pm$ 12
C2591 G2592	0 $\pm$ 0	34 $\pm$ 36	30 $\pm$ 34	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	66 $\pm$ 45
G2588/N2-Н...C2606/O2	98.6 $\pm$ 0.7	96 $\pm$ 3	96 $\pm$ 4	89 $\pm$ 2	38 $\pm$ 32	14 $\pm$ 28
C2606/N4-Н...G2588/O6	96 $\pm$ 2	87 $\pm$ 15	92 $\pm$ 8	93 $\pm$ 4	64 $\pm$ 22	22 $\pm$ 44
Внешние контакты Н93						
C1941 C1942	89 $\pm$ 7	56 $\pm$ 45	76 $\pm$ 8	50 $\pm$ 49	54 $\pm$ 39	0.1 $\pm$ 0.2
C1941 C1965	99 $\pm$ 1	32 $\pm$ 56	88 $\pm$ 18	93 $\pm$ 10	87 $\pm$ 14	3 $\pm$ 7
G2592/N2-Н...A1966/N7	99.0 $\pm$ 0.7	13 $\pm$ 23	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
A1786 A1938	0 $\pm$ 0	49 $\pm$ 2	50 $\pm$ 23	12 $\pm$ 16	2 $\pm$ 3	56 $\pm$ 4
G1770/N2-Н...A1786/N1	61 $\pm$ 13	81 $\pm$ 6	54 $\pm$ 40	20 $\pm$ 29	20 $\pm$ 23	0 $\pm$ 0
A1785/N6-Н...U1778/O2	98.3 $\pm$ 0.9	98 $\pm$ 2	96 $\pm$ 2	78 $\pm$ 33	85 $\pm$ 5	24 $\pm$ 35
U1778/N3-Н...A1785/N7	95 $\pm$ 2	96 $\pm$ 2	95 $\pm$ 4	85 $\pm$ 25	96 $\pm$ 4	28 $\pm$ 39
G2588/N2-Н...A1785/N1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	57 $\pm$ 34
A1783 A2587	25 $\pm$ 12	28 $\pm$ 15	0 $\pm$ 0	19 $\pm$ 22	57 $\pm$ 6	0 $\pm$ 0
A1783 G2588	3 $\pm$ 3	14 $\pm$ 19	53 $\pm$ 21	28 $\pm$ 25	0 $\pm$ 0	28 $\pm$ 10
Разворот A1937						
A1937/N6-Н...C1934/O2	0 $\pm$ 0	11 $\pm$ 2	12 $\pm$ 21	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	32 $\pm$ 27
A1937/N6-Н...G1964/N3	30 $\pm$ 21	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	51 $\pm$ 27	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
G1964/N2-Н...A1937/N1	96 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	93 $\pm$ 7	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Н71 сохраняет свою целостность, в мосту поддерживаются дополнительные связи между G1959 Н71 23S рРНК и A1483 h44 рРНК

Мутации в 23S рРНК, снижающие сродство тРНК к А-сайту

Из литературы известны две мутации 23S рРНК, снижающие сродство А-сайта бактериальной рибосомы к тРНК. Одна из них — это замена аденина в A2531 на пиримидины (С или U), другая же мутация есть замена двух подряд идущих уридинов 2492 и 2493 на цитидин в спирали Н89. Были получены по три независимые траектории длиной 200 нс для AP-систем с мутациями A2531U и UU2492-3C.

В полученных траекториях обе мутации действительно дестабилизировали характерные связи ССА-конца тРНК в А-сайте: дестабилизировался его сплошной стэкинг с А-спиралью, а сама А-спираль частично или полностью возвращалась в состояние, характерное для PE-систем, со сплошной стопкой G2553-U2554-U2555.

Таким образом, на состояние А-спирали способен влиять межспиральный контакт между Н95 и Н91 (A2531U), удаленный на 50Å или состояние участка Н89 за 20Å от

Таблица 3. Перераспределение нековалентных взаимодействий в рибосоме при смене ее функционального состояния согласно данным молекулярно-динамического моделирования. Тройное обозначение образование одной или нескольких водородных связей с остатком из первого столбца, двойная вертикальная черта || — стэкинг-взаимодействие. Прописными буквами указаны названия остатков 23S рРНК, строчными — 16S рРНК. **АР-состояние** — рибосома дикого типа с А/А- и Р/Р-тРНК. **Мутации** — рибосомы с тем же набором тРНК с мутацией UU2492-3С или А2531U. **РЕ-состояние** — рибосома дикого типа с fMet-Р/Р- и Е/Е-тРНК. **Пептиды в РТ** — рибосома с пептидил-Р/Р и Е/Е-тРНК, с последовательностью пептидных фрагментов fMFT или fMRFFR.

Остаток	АР-состояние	Мутации	Пептиды в РТ	РЕ-состояние
U2554	C74 (тРНК)	U2555	U2555	U2555
Ψ2580	...G2582	...G2508	...G2508	...G2508
G2505	...G2581	...G2581, ...C2610	...C2610	...C2610
U1944	U1955, ...G2557	U1955	U1955, G2557	G2557
G2592	...A1966	G2591	...A1966	G2591
G2603	C2601	...C2591	C2601, ...C2591	...C2591
G2588	...C2606 (H93)	...C2606 (H93)	...C2606 (H93)	A1785 (H65)
A1786	...G1770 (H65)	A1938 (H93)	...G1770 (H65)	A1938 (H93)
C1941	A1965	дестаб. A1965	A1965	-
A1937	...G1964 (H70)	...C1934 (H70)	...G1964 (H70)	...C1934 (H70)
A1783	A2587 (H93)	G2588 (H93)	A2587 (H93)	G2588 (H93)
A1785	...U1778 (H65)	...U1778 (H65)	...U1778 (H65)	...G2588 (H93)
A1848	A1847 (H68)	a702 (h23)	a702 (h23)	a702 (h23)
g1517	...u1406 (h44)	...u1406 (h44)	...c1496 (h44)	...c1496 (h44), ...g791 (h24)
m ⁶ ₂ a1519	a1499 (h44)	...g1497 (h44)	...g1497 (h44)	...g1497 (h44)
G1959	...a1483 (h44), C1958	...a1483 (h44), C1958	...a1483 (h44), C1958	-
a1483	...G1959 (H71)	...G1959 (H71)	...G1959 (H71)	...g1417 (h44)
U2074	C2073	C2073	C2073	...G2597 (H93)
G2238	...G2242, ...U2079	...A2241/...G2242	...G2242, ...U2079	...A2241

сайта (UU2492-3C). Механизмы этого воздействия, исходя из данных МД, следующие.

В случае А2531U изменение контактов между Н91 и Н95 разрывает контакт последней с А-спиралью (водородную связь А2564 и С2646). Это воздействие также упорядочивает связи G2574-С2512 и С2575-У2511 внутри Н91, что удаляет С2573 от взаимодействий с С75 А-РНК. Все эти изменения, по сути, локально воспроизводят РЕ-состояние.

Эффект от мутации UU2492-3C — это исчезновение связей с участием остатков U2492 и U2493, так, что компланарные тройки U2492-У2460-Г2490 и U2493-А2459-Г2458 превращались в соответствующие пары. Сместившееся основание А2459 перестает взаимодействовать с С957 из Н39 23S рРНК, так что данная мутация также

приводила к нарушению межспирального контакта. Эффект от расхождения контакта между H39 и H89 распространяется в том числе через основание C961, которое вместо общей стопки с A983 и оторванности от H89 (как в AP-состоянии), поддерживает стопку C961-A2031-Cm2498-C2499 (как в PE-состоянии), что происходит совсем недалеко от ПТЦ.

Смещение в сторону PE-состояния при введении мутаций затрагивало и многие другие, ранее обсуждаемые, участки рРНК, например, спираль H93 и ее связи или $\Psi 2580$ (табл. 3). Для оценки этого смещения была выявлена главная компонента потенциальных энергий взаимодействия между азотистыми основаниями остатков, участвующих в перераспределении связей. Проекция на главную компоненту, полученную на объединенных данных AP- и PE-траекторий, для рибосом с мутациями A2531U и UU2492-3C, оказались равны 37 ± 19 и 27 ± 20 , соответственно (с учетом стандартного отклонения). Эти значения для AP-состояния — 261 ± 19 , а для PE — -233 ± 20 . Мутации, таким образом, даже при наличии A-тРНК в системе, примерно на половину смещают ее конформационное состояние в сторону такового при связывании E-тРНК.

Влияние пептидов в РТ на E-тРНК

Исследования взаимодействий E-тРНК с другими тРНК (Chen, C. et al., 2011) показали, что вновь синтезированная пептидная цепь в зависимости от длины и состава способна снижать аффинность E-сайта рибосомы к тРНК. Поэтому для изучения возможного механизма влияния пептида в РТ на тРНК в E-сайте были выбраны пептиды fMet-Phe-Thr (fMFT) fMRFFR, о способности которых вызывать спонтанную диссоциацию E-тРНК достоверно известно.

Оба пептида взаимодействовали с остатками U2585 и U2586, непосредственно прилегающими к H93, расстояние до которых формилметионинового фрагмента (связанного с P-тРНК в ранее моделируемом PE-состоянии) было достаточно большим.

Это оказывало влияние на сайт связывания C75 E-тРНК: основания U2074 и G2238 образовывали связи, воспроизводящие AP-состояние. В результате, универсально консервативная стопка A2432-A199-A2433-A2434 E-сайта смещалась примерно на половину расстояния между основаниями в стэкинг-взаимодействии, что сказалось на прочности связей, удерживающих E-тРНК, чье связывание как раз зависит

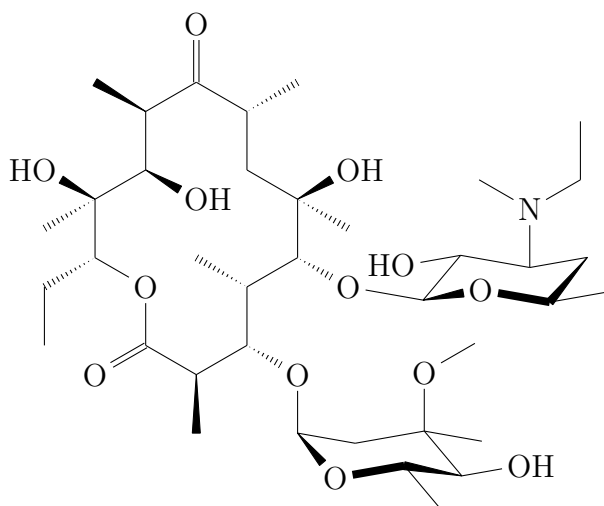


Рис. 5. Эритромицин.

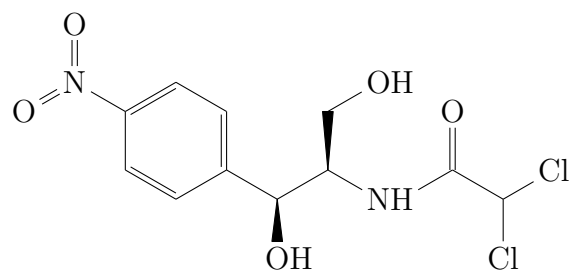


Рис. 6. Хлорамфеникол.

от правильной взаимной ориентации всех ее сайтов связывания в пространстве. Положение Е-тРНК в наведенном АР-подобном состоянии рибосомы оказалось настолько искажено, что разрывало внутренние связи самой Е-тРНК, самый яркий пример которого — это расхождение уотсон-криковской пары G20 и C57 на “локте” тРНК в области его стэкинг-контактов с протуберанцем L1. По направлению к А-сайту, антагонисту Е-сайта, локальное восстановление РЕ-состояния способствовало восстановлению целостности стопки A1966-C1965-C1941-C1942-U1943, вершины спирали H71 и межсубъединичного моста ВЗ 3.

Предположительный механизм воздействия антибиотиков, связывающихся в РТ, на А-сайт

Найденные в ходе моделирования МД переключения конформации А-сайта очевидно могут быть задействованы в аллостерической остановке синтеза пептидной цепи. Существует множество свидетельств того, что верхняя часть РТ непосредственно участвует в подобной регуляции: некоторые антибиотики, с ней связывающиеся, останавливают трансляцию через определенное количество циклов элонгации.

Были исследованы два антибиотика, связывающихся в РТ в различных сайтах: эритромицин (рис. 5) и хлорамфеникол (рис. 6).

Лактонное кольцо эритромицина встраивается между остатками A2058 и A2059 23S рРНК, углеводный заместитель дезозамин фиксирует положение антибиотика водородными связями с A2058, а кладиноза, согласно структурным данным, свободно располагается в просвете туннеля. Однако, удаление этого углеводного остатка, равно как и мутации по остаткам G2505 и C2610, не взаимодействующим с эритромицином

Таблица 4. Встречаемости нековалентных взаимодействий в молекулярно-динамического моделировании систем рибосомы как в каноническом в AP-состоянии, так с добавлением антибиотиков эритромицина (Ery) и хлорамфеникола (Clm) в сравнении с PE-состоянием. Значения встречаемостей представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение.

Взаимодействие	AP- состояние	AP (Ery)	AP (Clm)	PE- состояние
А-сайт				
Ψ2580/N3-H...G2508/O6	0 $\pm$ 0	89 $\pm$ 9	92 $\pm$ 2	86 $\pm$ 15
G2508/N1-H...Ψ2580/O4	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	24 $\pm$ 4	98.3 $\pm$ 0.7
Ψ2580/N1-H...G2582/O6	32 $\pm$ 23	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
G2509 Ψ2580	0 $\pm$ 0	65 $\pm$ 21	16 $\pm$ 10	43 $\pm$ 24
G2505/N2-H...C2610/N3	0 $\pm$ 0	2 $\pm$ 2	26 $\pm$ 37	33 $\pm$ 26
G2505/N1-H...C2610/O2	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1	20 $\pm$ 29	28 $\pm$ 39
G2582/N2-H...G2553/N3	1 $\pm$ 2	71 $\pm$ 4	47 $\pm$ 25	52 $\pm$ 25
G2553 U2554	0 $\pm$ 0	66 $\pm$ 48	72 $\pm$ 34	96 $\pm$ 3
U2554 U2555	7 $\pm$ 14	61 $\pm$ 44	30 $\pm$ 18	68 $\pm$ 28
(tRNA)C74 U2555	95 $\pm$ 3	38 $\pm$ 52	63 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0
H93				
C1941 C1942	89 $\pm$ 7	37 $\pm$ 10	53 $\pm$ 3	0.1 $\pm$ 0.2
C1941 C1965	99 $\pm$ 1	58 $\pm$ 50	51 $\pm$ 67	3 $\pm$ 7
A1937/N6-H...C1934/O2	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	27 $\pm$ 24	32 $\pm$ 27
G1964/N2-H...A1937/N1	96 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
A1783 A2587	25 $\pm$ 12	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
A1783 G2588	3 $\pm$ 3	11 $\pm$ 9	38 $\pm$ 17	28 $\pm$ 10
Мост В7а и Е-сайт				
A1848 a702	0.1 $\pm$ 0.2	37 $\pm$ 22	48 $\pm$ 4	51 $\pm$ 20
A1847 A1848	45 $\pm$ 10	18 $\pm$ 30	0 $\pm$ 0	5 $\pm$ 8
C2073 U2074	99.4 $\pm$ 0.3	33 $\pm$ 12	72 $\pm$ 21	0 $\pm$ 0
A2241/N6-H...G2238/N7	0 $\pm$ 0	26 $\pm$ 46	61 $\pm$ 40	82 $\pm$ 10
G2238/N1-H...G2242/O6	88 $\pm$ 6	61 $\pm$ 53	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
G2238/N2-H...U2079/O4	84 $\pm$ 13	49 $\pm$ 43	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

согласно структурным данным, но наиболее близко расположенным к кладинозе, предотвращают взаимодействие антибиотика со стоп-пептидом *ermBL*.

В траекториях МД остаток кладинозы эритромицина стерически препятствует C2610 занимать то же положение, что и в AP-состоянии — сильно смещенное от взаимодействия с G2505 в сторону связанной стэкинг-взаимодействием пары U2609-U1782. Это возвращает Ψ2580 во внутриспиральное PE-подобное положение. Разворот Ψ2580 приподнимает стопку 2582-2584, и это стерически смещает A76 А-тРНК из канонического положения, из-за чего вся ССА-стопка тРНК может выйти из общего стэкинга с А-спиралью.

Правда, выход ССА-конца А-тРНК из сайта происходит не во всех кадрах траекторий с эритромицином, а примерно в половине, хотя переключение основания

Ψ2580 происходило во всех случаях (табл. 4). Вероятно, влияние стерических факторов в рибосомном туннеле усиливается при прохождении вновь синтезированной цепи вдоль по туннелю мимо связавшегося антибиотика.

Алlostерическое влияние антибиотика хлорамфеникола было исследовано не в том положении на рибосоме, которое чаще всего встречается в структурных данных, а в найденной нами методами докинга и молекулярной динамики позе, в которой антибиотик располагается между Ψ2504 и U2506 и образует с ними стэкинг-контакты. Такое расположение антибиотика значительно лучше объясняет биохимические данные и не противоречит, в отличие от ранее известной позы, ПТР на первых циклах элонгации. Впрочем, здесь рассмотрим алlostерическое влияние хлорамфеникола в найденном положении на другие участки рибосомы.

Оно оказалось во многом похоже на воздействие эритромицина: изменение положения Ψ2504 и U2506 сказалось на соединяющем их нуклеотиде G2505, что точно так же возвращало псевдоуридин Ψ2580 во внутриспиральное положение, характерное для РЕ-состояния. Это положение способствовало возвращению в РЕ-подобное состояние и А-спирали в части кадров траектории (табл. 4).

Влияние исследованных антибиотиков в РТ также простирается далеко за пределы самого РТ. Например, они могут восстанавливать мост В7а, характерный для РЕ-состояния, или же смещать связи внутри и вокруг спирали Н93 (табл. 4), что вновь говорит о глобальном характере алlostерических явлений в рибосоме.

Выводы

1. Построенная в данной работе молекулярно–динамическая модель хорошо согласуется с известными экспериментальными данными.
2. Антагонизм между А– и Е–сайтами большой субъединицы рибосомы осуществляется, главным образом, через воздействие, передающееся от С75 Е–тРНК на Н93, имеющую связи как с ПТЦ, так и с А–спиралью.
3. А–сайт большой субъединицы рибосомы может находиться в одной из двух конформаций: “открытой” с выпетливанием Ψ 2580 по направлению к РТ или “закрытой”, в которой стэкинг–взаимодействия между G2553-U2554-U2555 препятствуют связыванию тРНК.
4. Конформации межсубъединичных мостов В7а, В2а/d и В3 связаны с состоянием А–сайта, благодаря чему они участвуют в регуляции связывания с этим сайтом тРНК.
5. Переключение А–сайта между обнаруженными “открытой” и “закрытой” конформациями имеет универсальный характер, и, скорее всего, играет ключевую роль в остановке ПТР различными аллостерическими регуляторами.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.02.03 по специальности 02.00.10 — биоорганическая химия (химические науки):

1. *Shishkina A. V., Makarova, T. M., Tereshchenkov A. G., Makarov G. I., Korshunova G. A., Bogdanov A. A.* Modeling interactions of erythromycin derivatives with ribosomes // *Biochemistry (Moscow)*. — 2015. — Vol. 80, No. 11. — P. 1500-1507. IF=1,886.
2. *Makarov G. I., Makarova, T. M., Sumbatyan N. V., Bogdanov A. A.* Investigation of ribosomes using molecular dynamics simulation methods // *Biochemistry (Moscow)*. — 2016. — Vol. 81, No. 13. — P. 1579-1588. IF = 1,886.
3. *Makarova, T. M., Bogdanov A. A.* The ribosome as an allosterically regulated molecular machine // *Biochemistry (Moscow)*. — 2017. — Vol. 82, No. 13. — P. 1557-1571. IF = 1,886.
4. *Makarov G. I., Makarova, T. M.* A noncanonical binding site of chloramphenicol revealed via molecular dynamics simulations // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. — 2018. — Vol. 1862, No. 12. — P. 2940-2947. IF = 3,681.
5. *Makarova, T. M., Bogdanov A. A.* Allosteric regulation of the ribosomal A site revealed by molecular dynamics simulations // *Biochimie*. — 2019. — Vol. 167. — P. 179-186. IF = 3,362.

Тезисы докладов и материалы конференций

1. *Makarova, T.* Molecular dynamics study of allosteric signal transmission between E-site and elongation factor G binding site // IX International conference of young scientists on chemistry “Mendeleev 2015” Book of abstracts. — Saint Petersburg State University, 2015. — P. 261.
2. *Makarova, T.* Molecular-dynamics study of allosteric pathways in bacterial ribosome // International School-Seminar on Computer-Aided Molecular Design Book of abstracts. — Kazan, Russia, 2016. — P. 13.

3. *Makarov G., Makarova, T.M., Bogdanov A.* Investigation of nascent peptide exit tunnel by means of molecular dynamics simulations // International symposium “Molecular Simulation Studies in Material and Biological Sciences”, St. Petersburg, September 7-10, 2017. — St.Petersburg: Petersburg Nuclear Physics Institute (PNPI) of the National Research Center “Kurchatov Institute”, 2017. — P. 9-10.
4. *Makarova, T.* Allosteric regulation of tRNAs binding to the ribosome revealed via molecular dynamics simulations // X International conference of young scientists on chemistry “Mendeleev 2017” Book of abstracts. — Saint Petersburg State University, 2017. — P. 382.
5. *Makarova, T.* Allosteric switches in bacterial ribosome revealed via molecular-dynamics simulations // FEBS Open Bio. Vol. 8. — Prague, Czech Republic, 2018. — P. 25. — (ShT.09-1).