



Biomolecular
Machines
Laboratory



Fundacja na rzecz
Nauki Polskiej

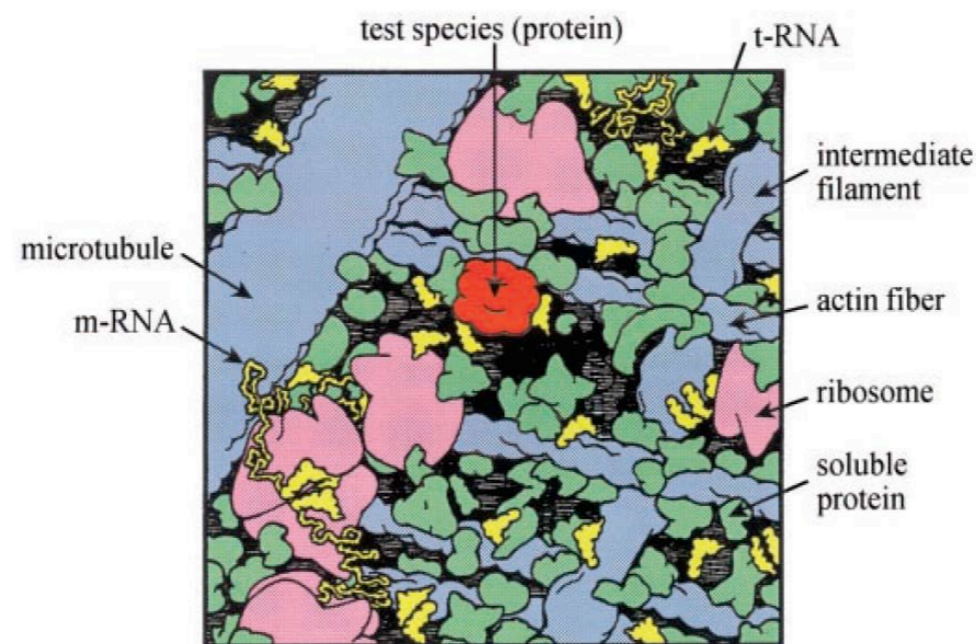
Modelowanie molekularne rybosomu

Joanna Trylska

ICM, Uniwersytet Warszawski

Maszyny biomolekularne w komórce

- wiele zadań wykonywanych jest przez złożone kompleksy makromolekularne a nie pojedyncze białka
- kompleksy te mają różną budowę i funkcję
- komórka musi nadzorować pracę tysięcy maszyn w czasie i przestrzeni



Maszyna biomolekularna

- makromolekuła, która wykonuje powtarzające się zadania
- działa w określonej temperaturze
- jest napędzana źródłem energii np. ATP, fotony
- traci energię, gdy wykonuje pracę
- sama się buduje/składa



Cechy maszyn biomolekularnych

- wypracowane przez ewolucję a nie zaprojektowane
- działają w specyficznym chaotycznym środowisku (woda, określone pH, jony)
- oddziałują poprzez przypadkowe ruchy i dyfuzję
- budulcem jest biomateria: białka, kwasy nukleinowe, lipidy, węglowodany
- kształt i funkcja zależą od składu atomowego i szczególnych właściwości wody
- żyją krótko
- ruchy termiczne odgrywają znaczącą rolę



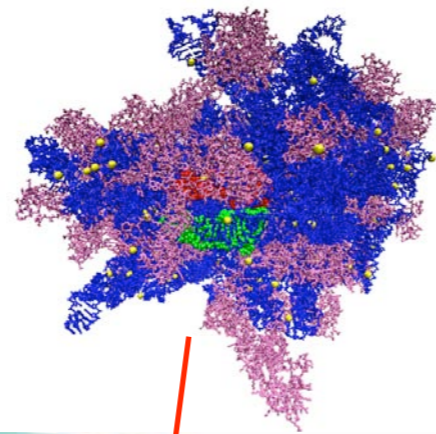
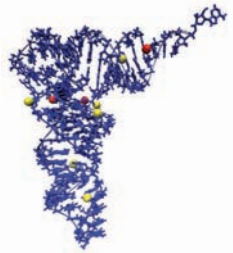
Maszyna translacyjna

- Jak się tworzy i z czego się składa?
- Jak wygląda jej dynamika wewnętrzna?
- Jak działa?
- Jak ją zablokować?

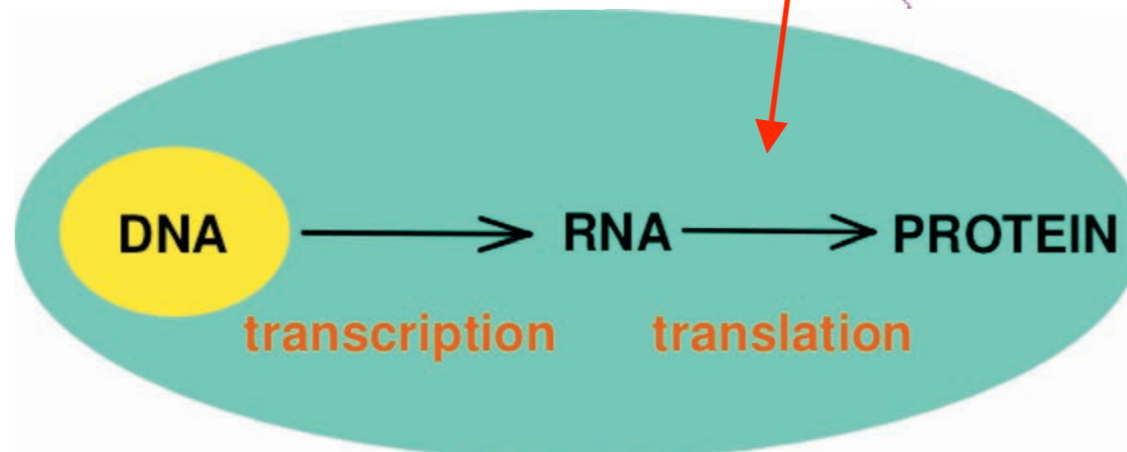


Rybosom - fabryka białek

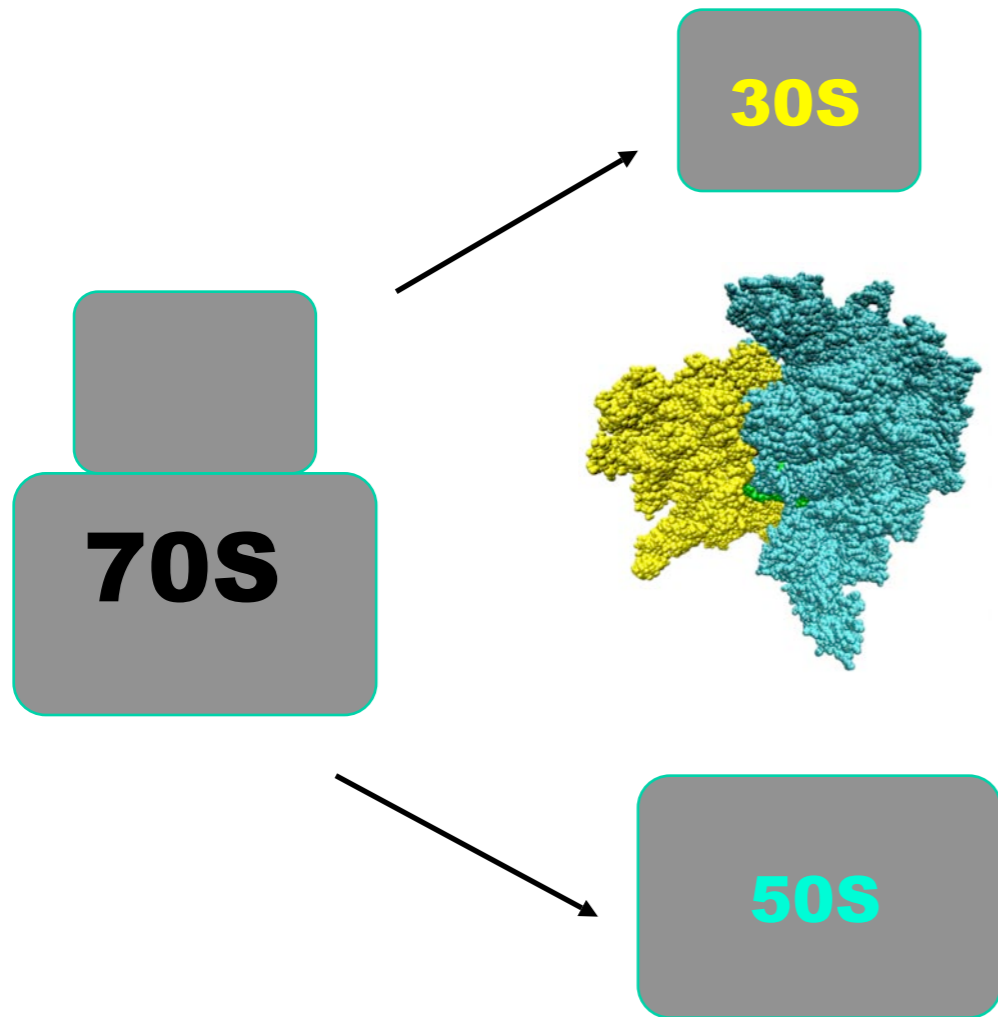
- kompleks białek i RNA
- wiąże i pozycjonuje mRNA i aminoacylo-tRNA
- katalizuje tworzenie wiązań peptydowych pomiędzy aminokwasami



wymiary - 27x25x25nm
2/3 masy stanowi RNA



Rybosom bakteryjny



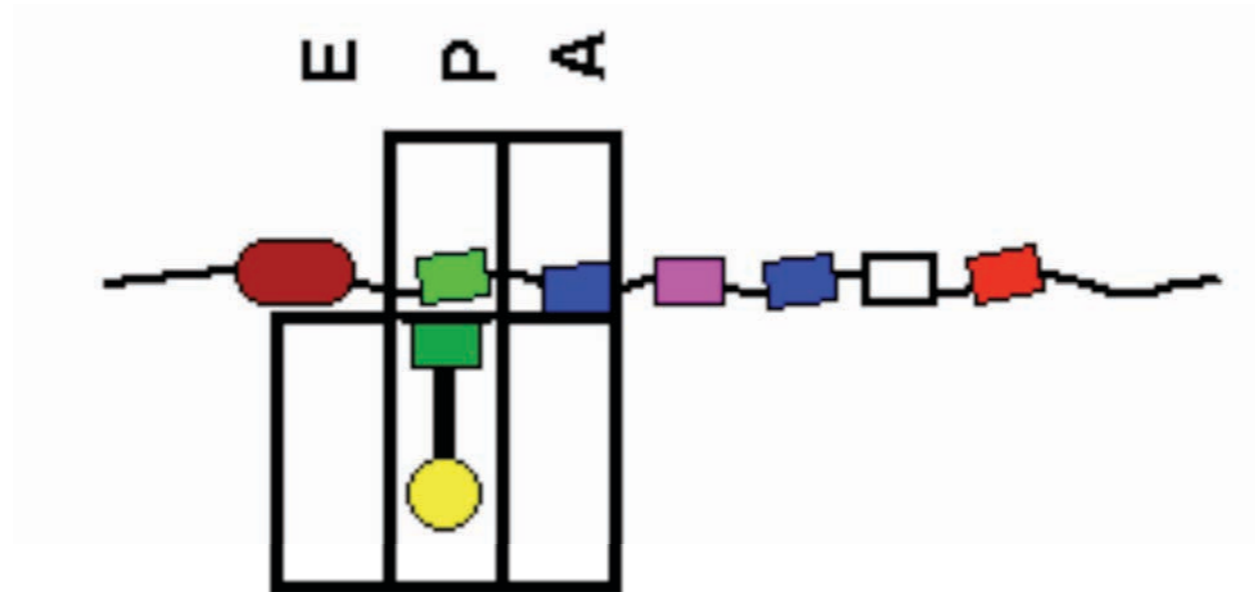
- 21 białek
 - 16S RNA ~1500 nukleotydów
 - ~95000 atomów
-
- ponad 30 białek
 - 23S RNA ~2900 nukleotydów
 - 5S RNA ~120 nukleotydów
 - ~140000 atomów



Translacja

30S

50S



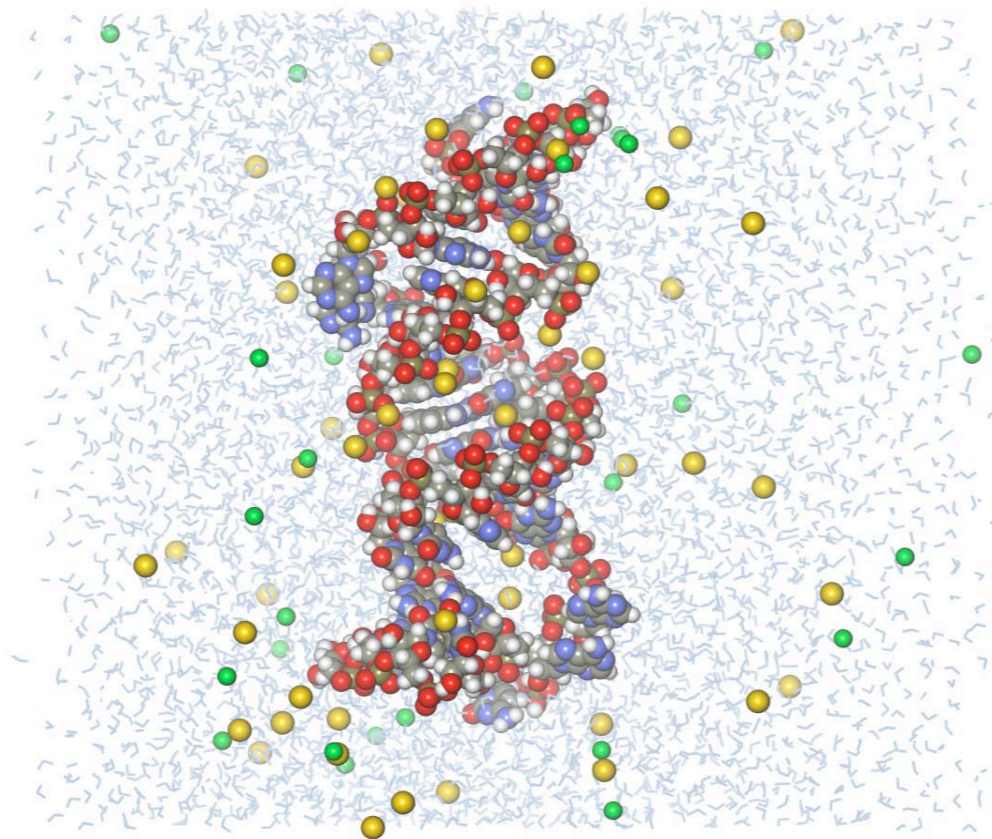
from Biochemistry Course, Carnegie Mellon Univ., Pittsburgh



Dynamika molekularna

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i} = m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2}$$

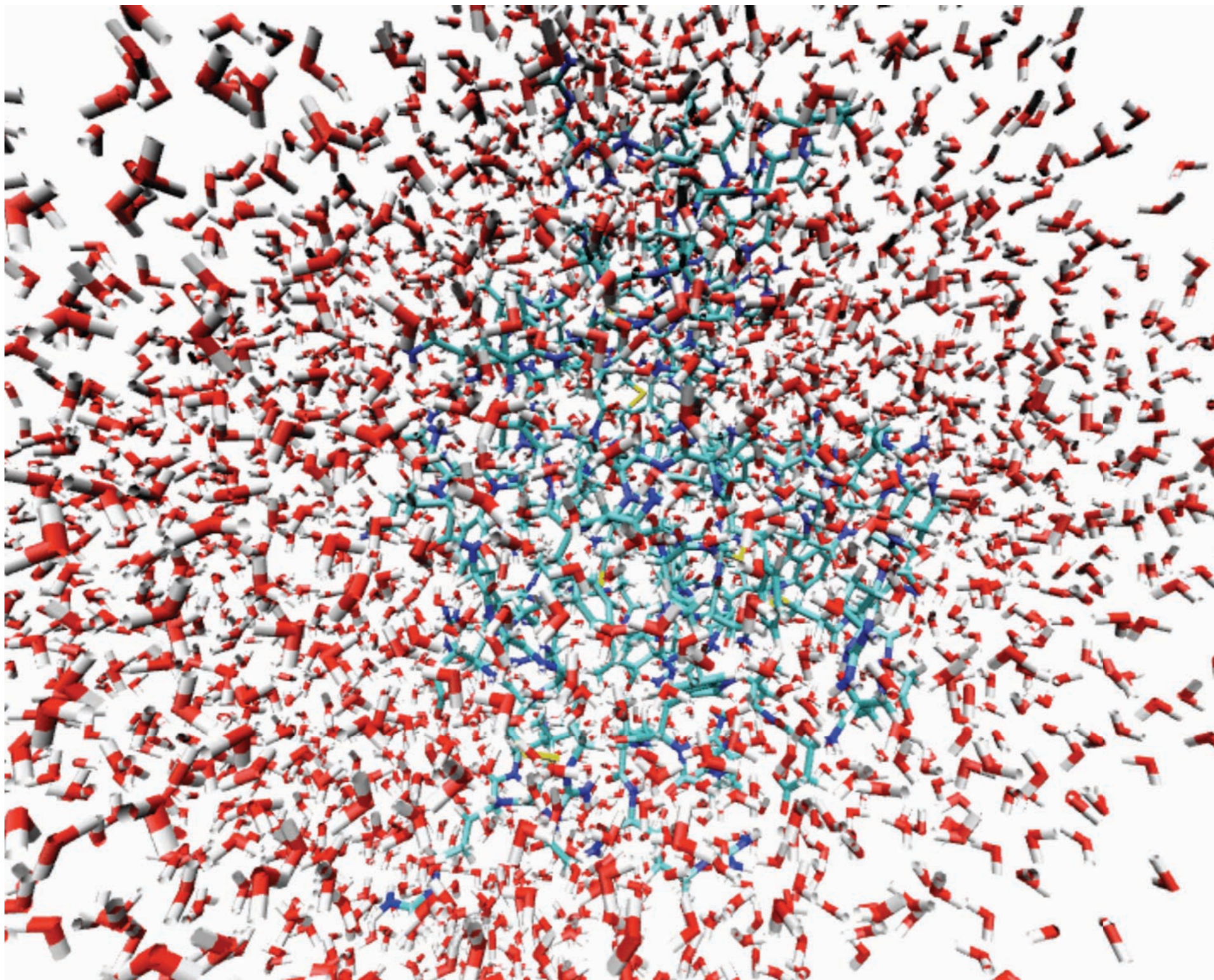
$$V(\mathbf{R}) = \sum_{pairs} \frac{1}{2} k_{bond} (r - r_0)^2 + \sum_{angles} \frac{1}{2} k_{ang} (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} \sum_{n=1}^3 \frac{1}{2} k_{dih} (1 + \cos(n\phi - \phi_0)) + \sum_{i>j} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} + \sum_{i>j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right)$$



pola siłowe: Charmm i Amber



Trajektoria ruchu



Adam Górecki

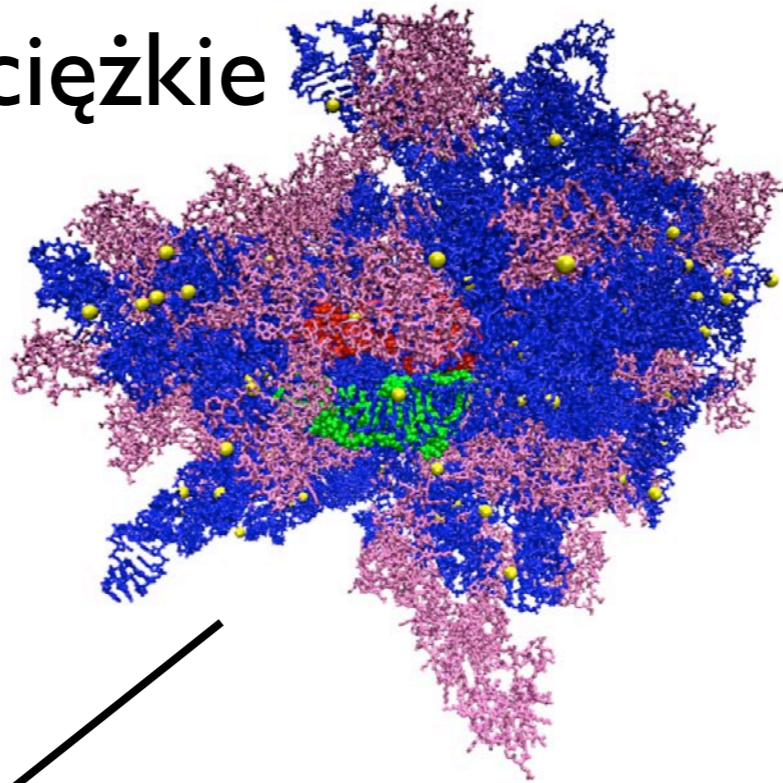


Dlaczego modele zredukowane?

- zmniejszamy liczbę stopni swobody
- czasy symulacji mogą być rzędu mikrosekund
- możemy wtedy badać struktury rozwiązane z niską rozdzielczością

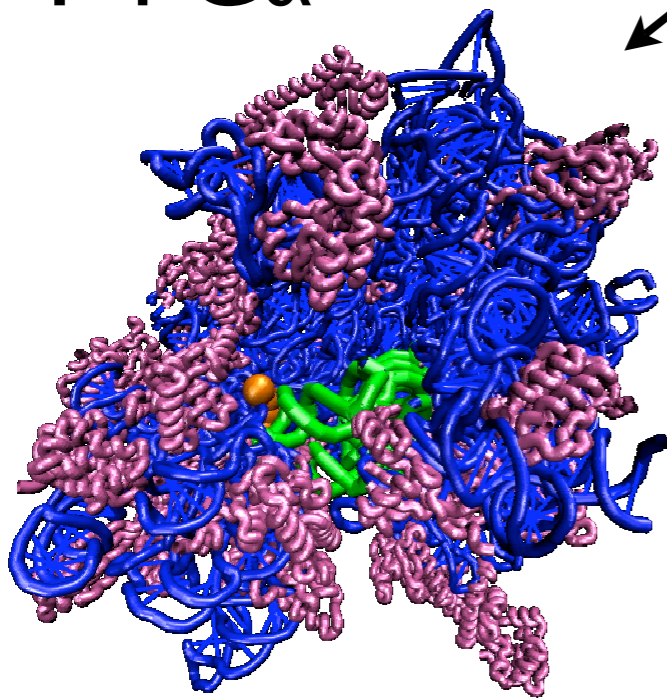


Atomy ciężkie



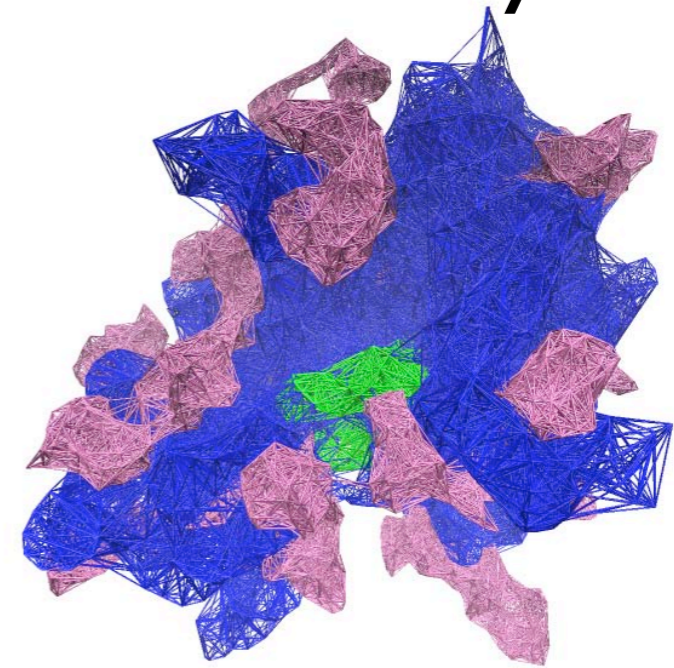
C.S.Tung, K. Sanbonmatsu
Biophys. J. 2004

P i C α



Yusupov et al., Science, 292, 883, 2001

Sieć elastyczna



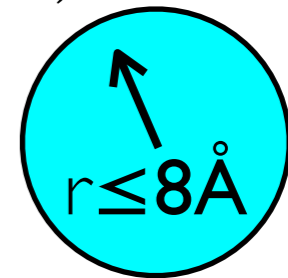
$$U(r) = \epsilon(r_0)(1 - \exp(-\alpha(r - r_0)))^2$$

Pole siłowe

$$U = \underbrace{U_{bond} + U_{angle} + U_{dihedral}}_{\text{bonded interactions}} + \underbrace{U_{nonbonded}}_{U_{local} + U_{nonlocal}}$$

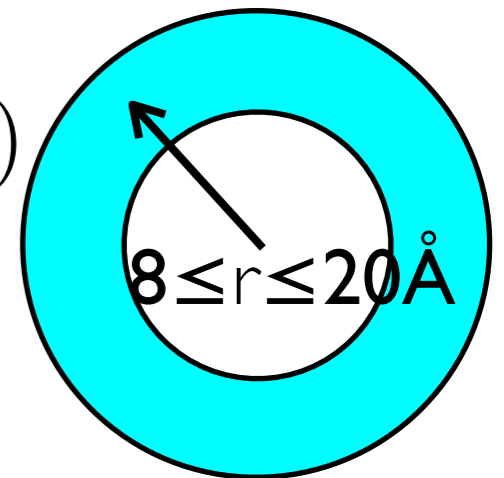
U_{local} within cutoff (r_0 from the starting geometry)

$$U_{local}(r) = \epsilon(r_0) \left[1 - e^{-\alpha(r-r_0)} \right]^2$$

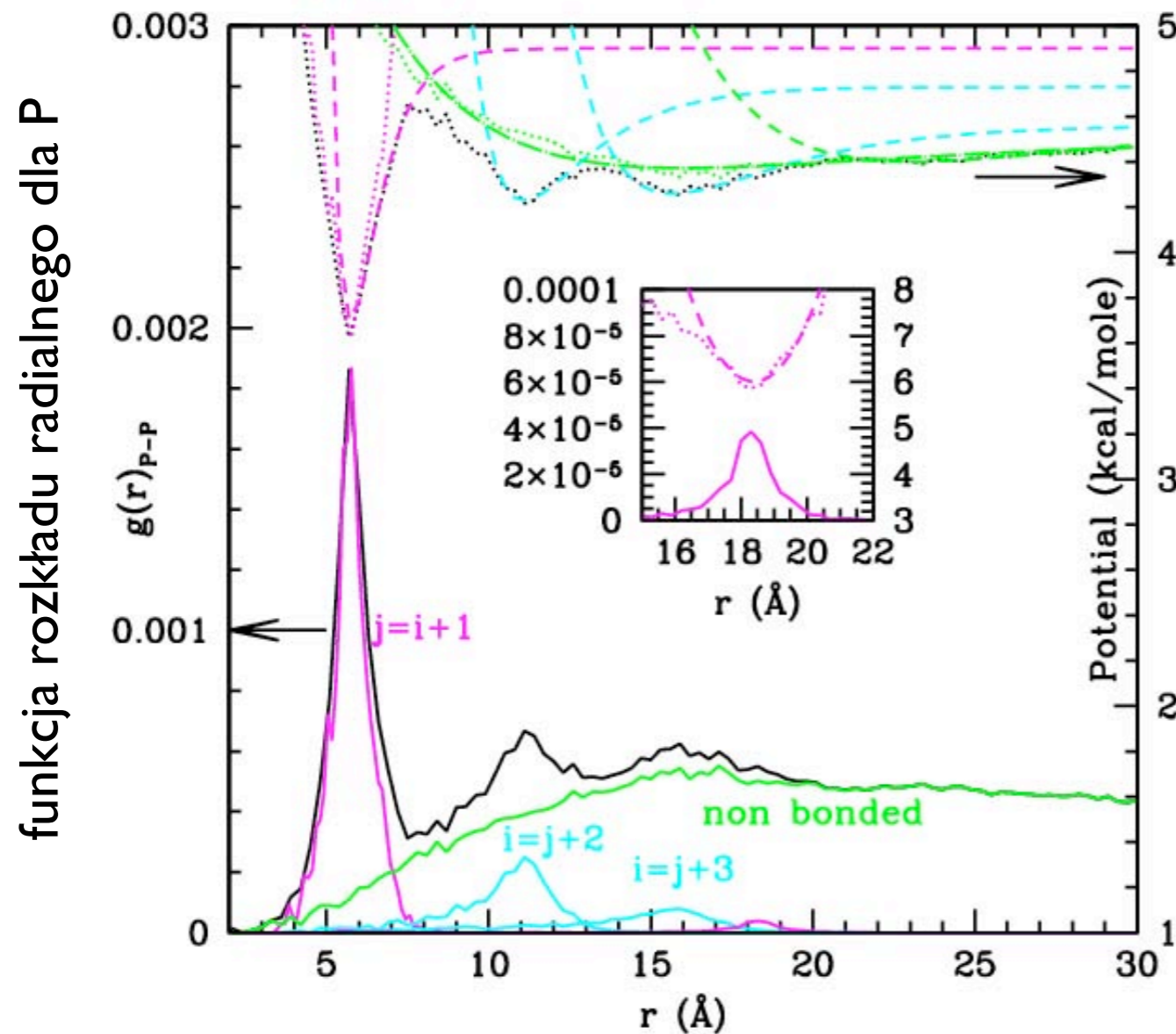


$U_{nonlocal}$ outside cutoff (r_{eq} depends on atom type)

$$U_{nonlocal}(r) = \epsilon(r_{eq}) \left[1 - e^{-\alpha(r-r_{eq})} \right]^2 + U_{elec}$$



Potencjały oparte na statystyce

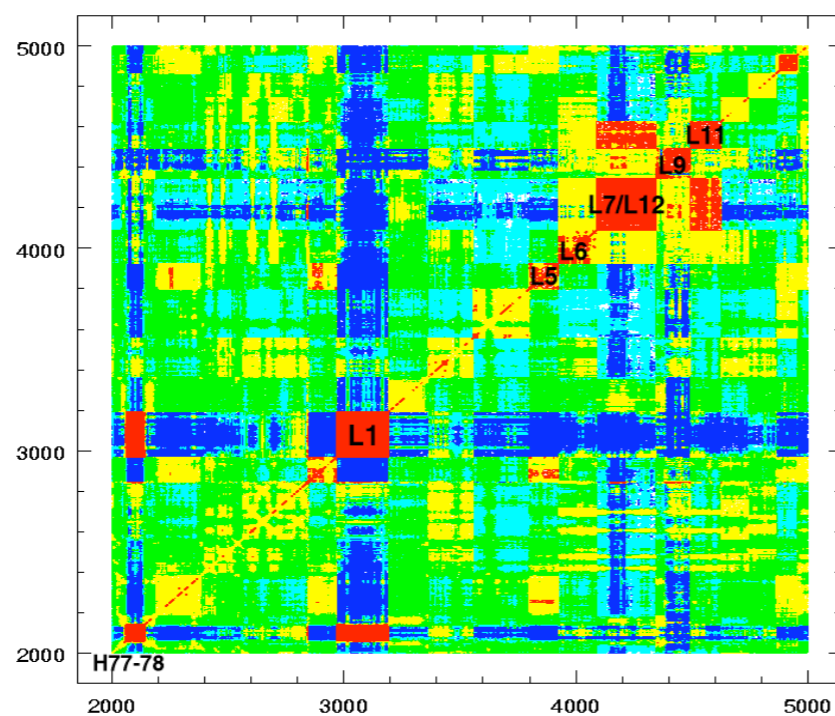
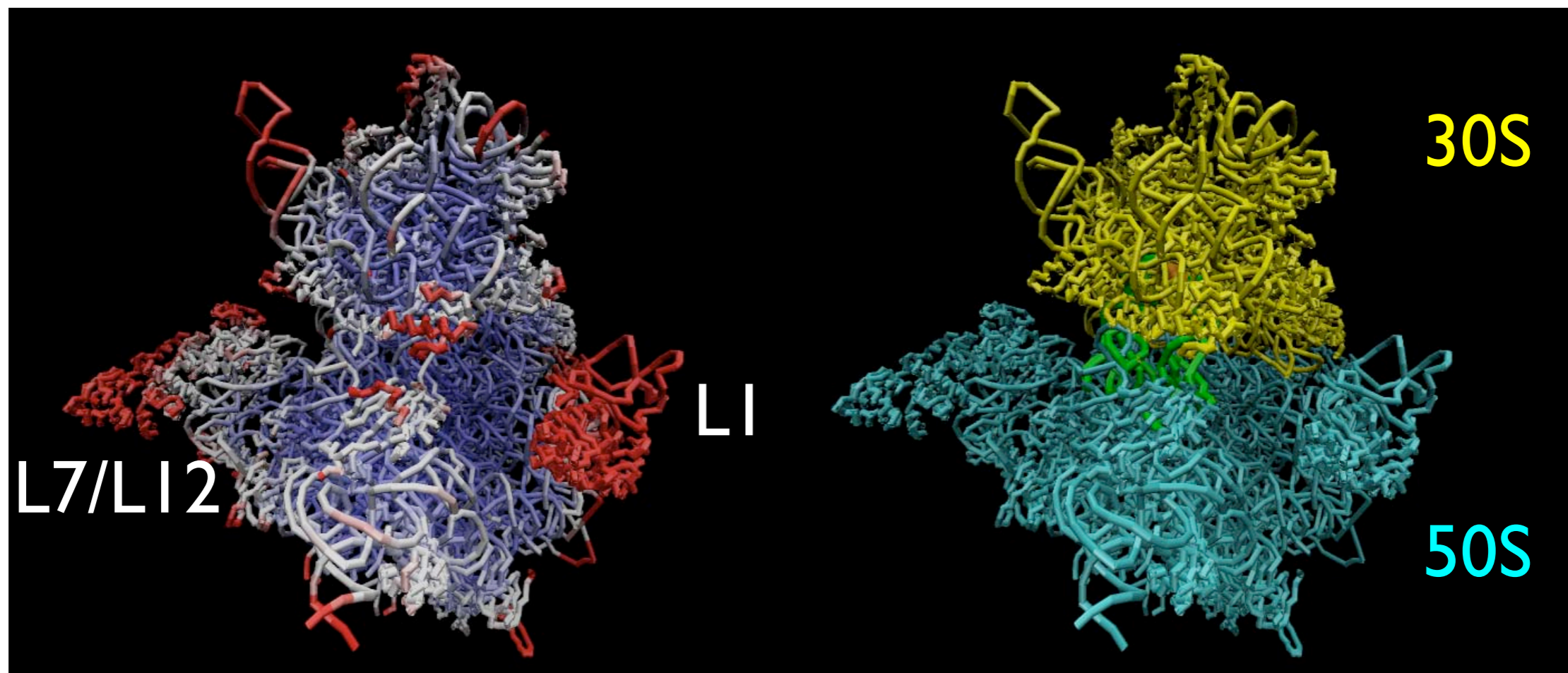


$$U(q) = -k_b T \ln(P(q))$$

konfiguracje
obserwowane często
odpowiadają stanom o
niskiej energii



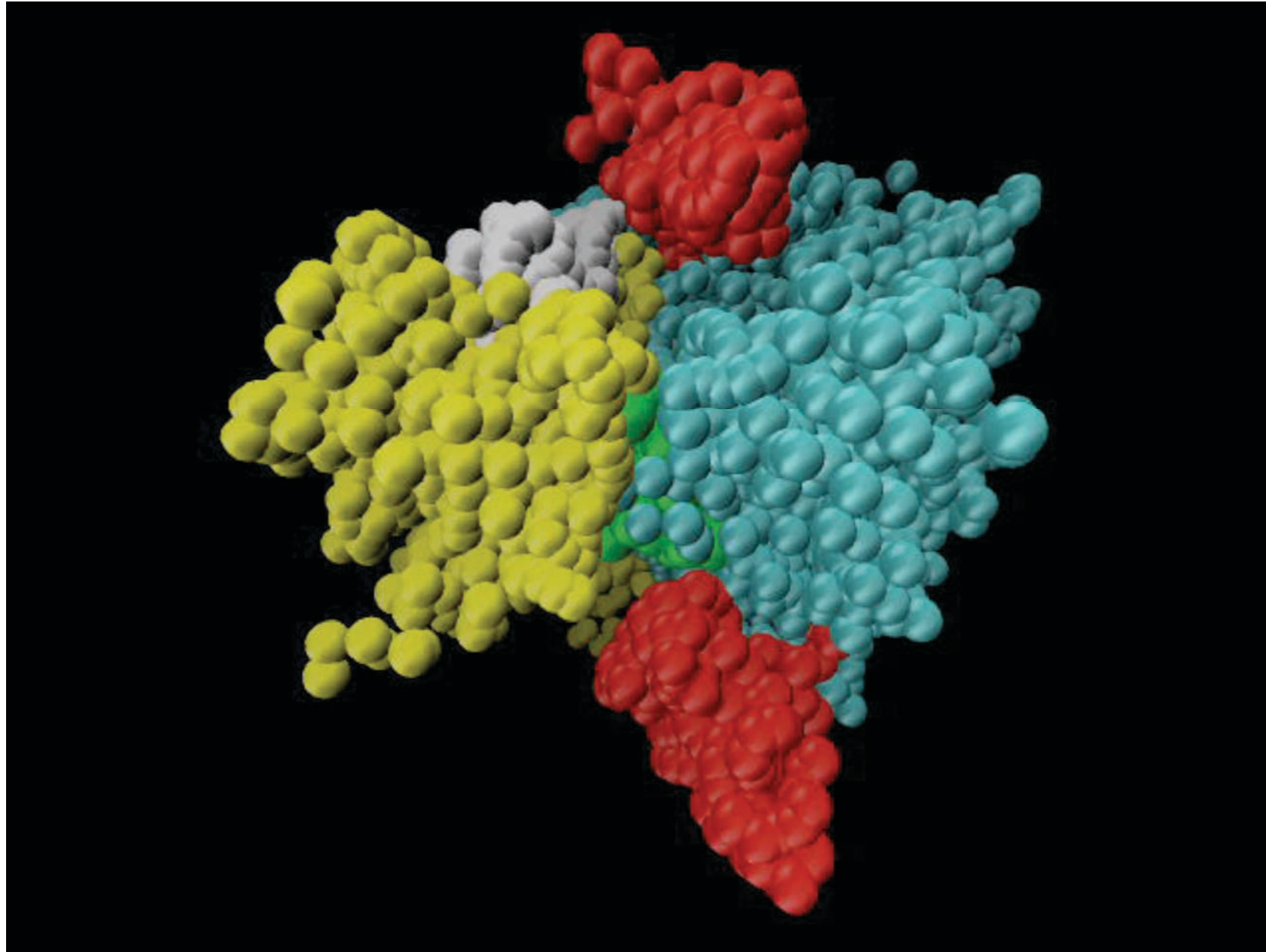
Łodygi rybosomu



Red (+I)
Yellow
Green
Cyan
Blue (-I)



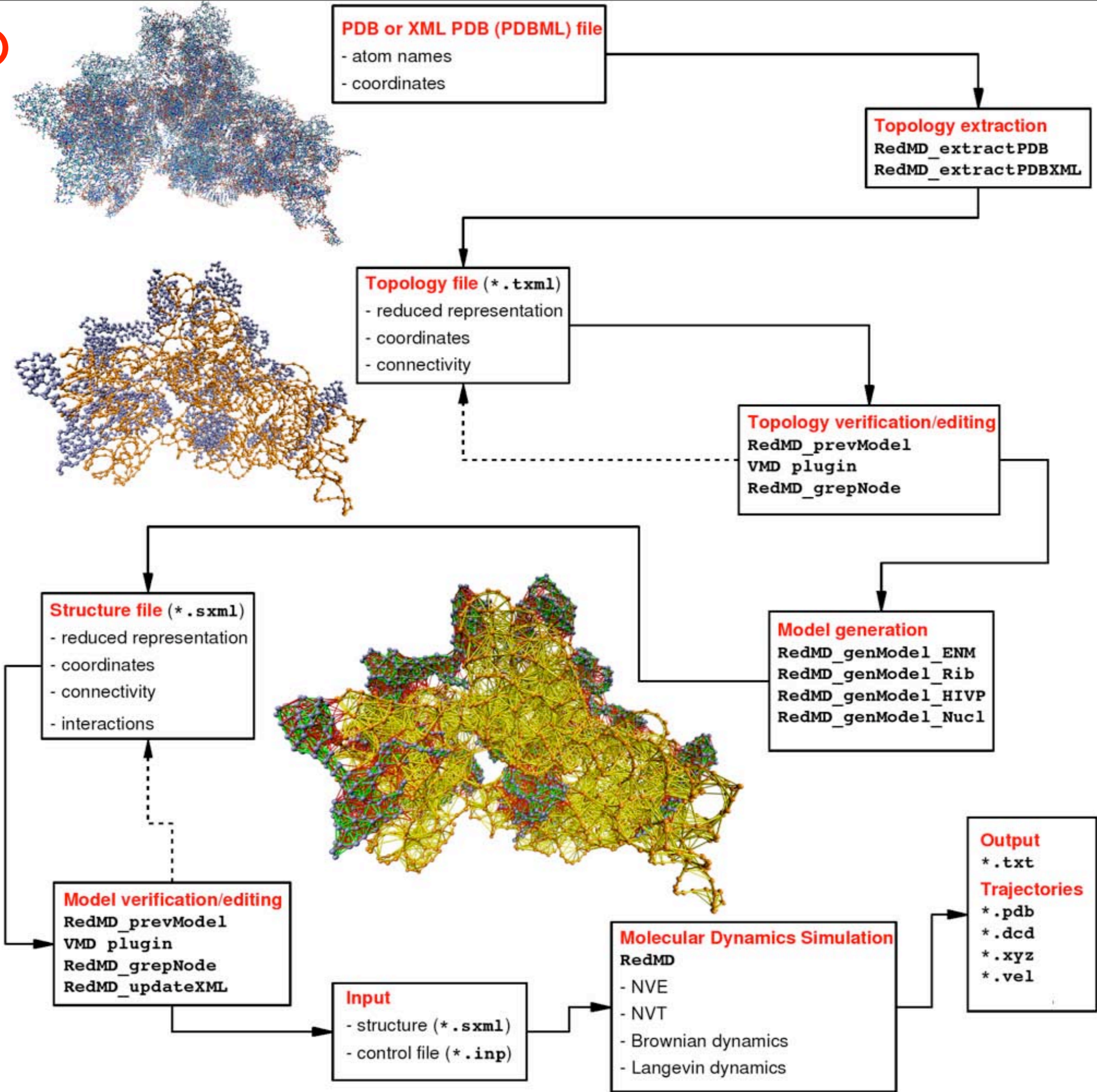
Ruch łożyg w przeciwfazie



Trylska et al., Biophys. J., 2005



RedMD





Navigation

- [Home](#)
- [Research](#)
- [People](#)
- [Software](#)
- [Publications](#)
- [Group wiki](#)

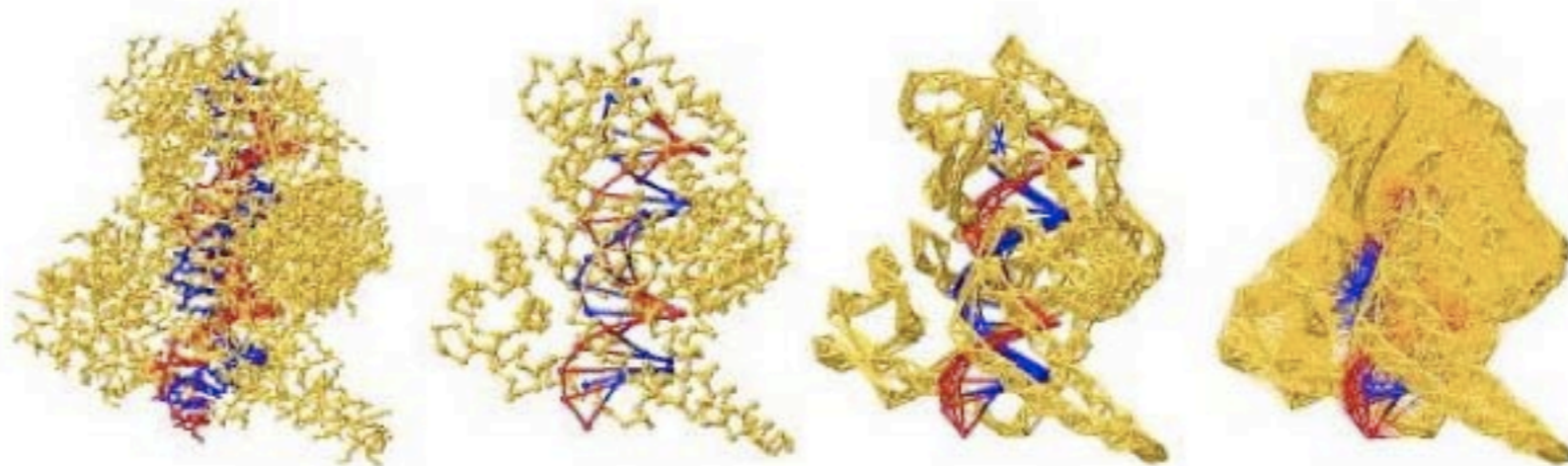
Log In

Login Name

Password

[Forgot your password?](#)

Software



RedMD - a package for Reduced Molecular Dynamics

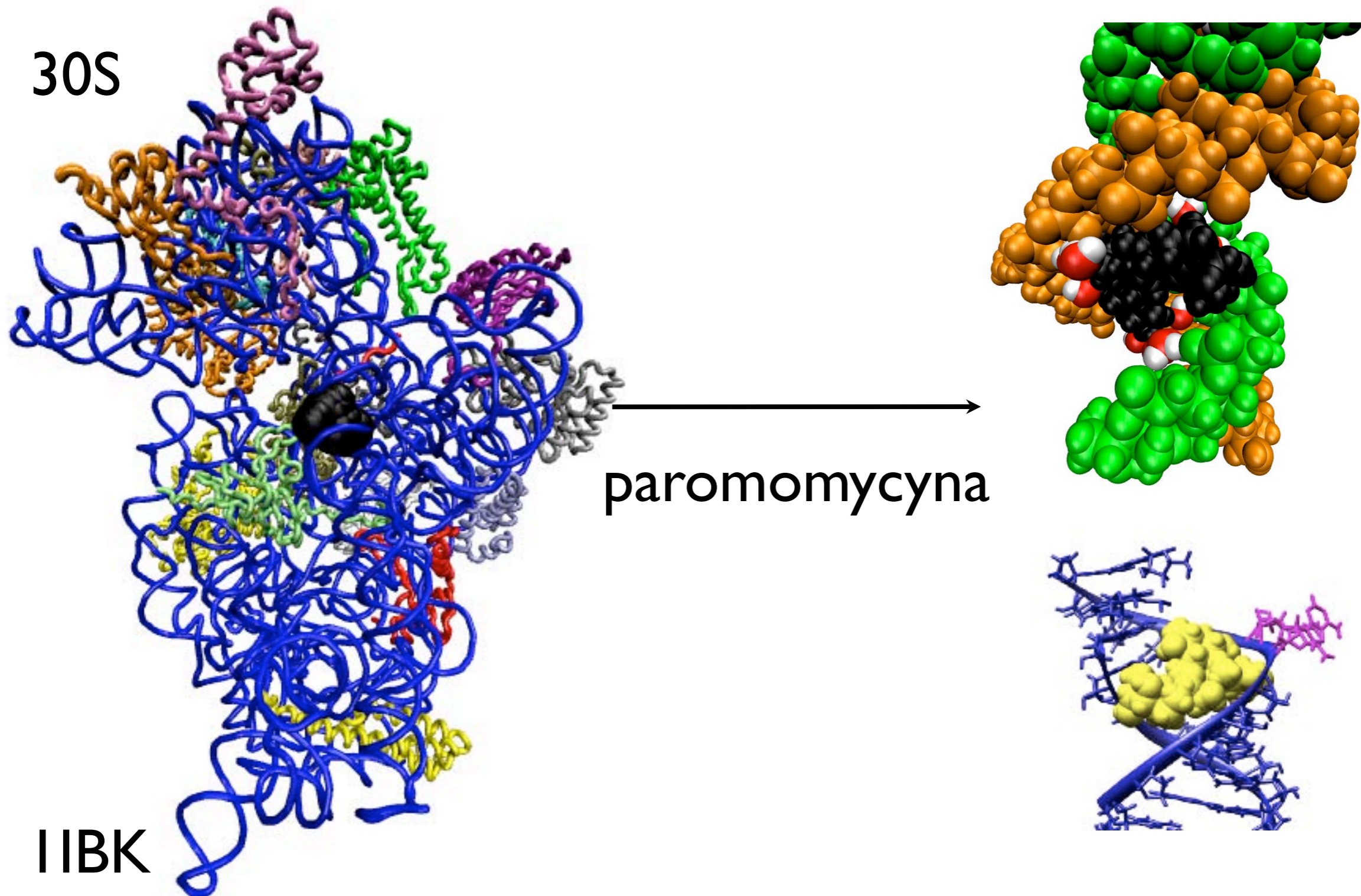
RedMD is a software to perform molecular dynamics simulations for coarse-grained models of proteins, nucleic acids and their complexes. Simulations can be carried out in the microcanonical ensemble, with Berendsen and Langevin thermostats, as well as with Brownian dynamics. We provide tools to generate initial configuration and topology from the PDB or PDB XML file formats. Force fields are based on the elastic network approach and its extensions. The code is written in C/C++ languages and the structure/topology of a molecule is based on an XML format.

Manual (6.1MB) is available [here](#). To download the software go to [registration page](#). See [Changelog](#) for updates and bug fixes.

All questions and suggestions are welcome at redmd@icm.edu.pl



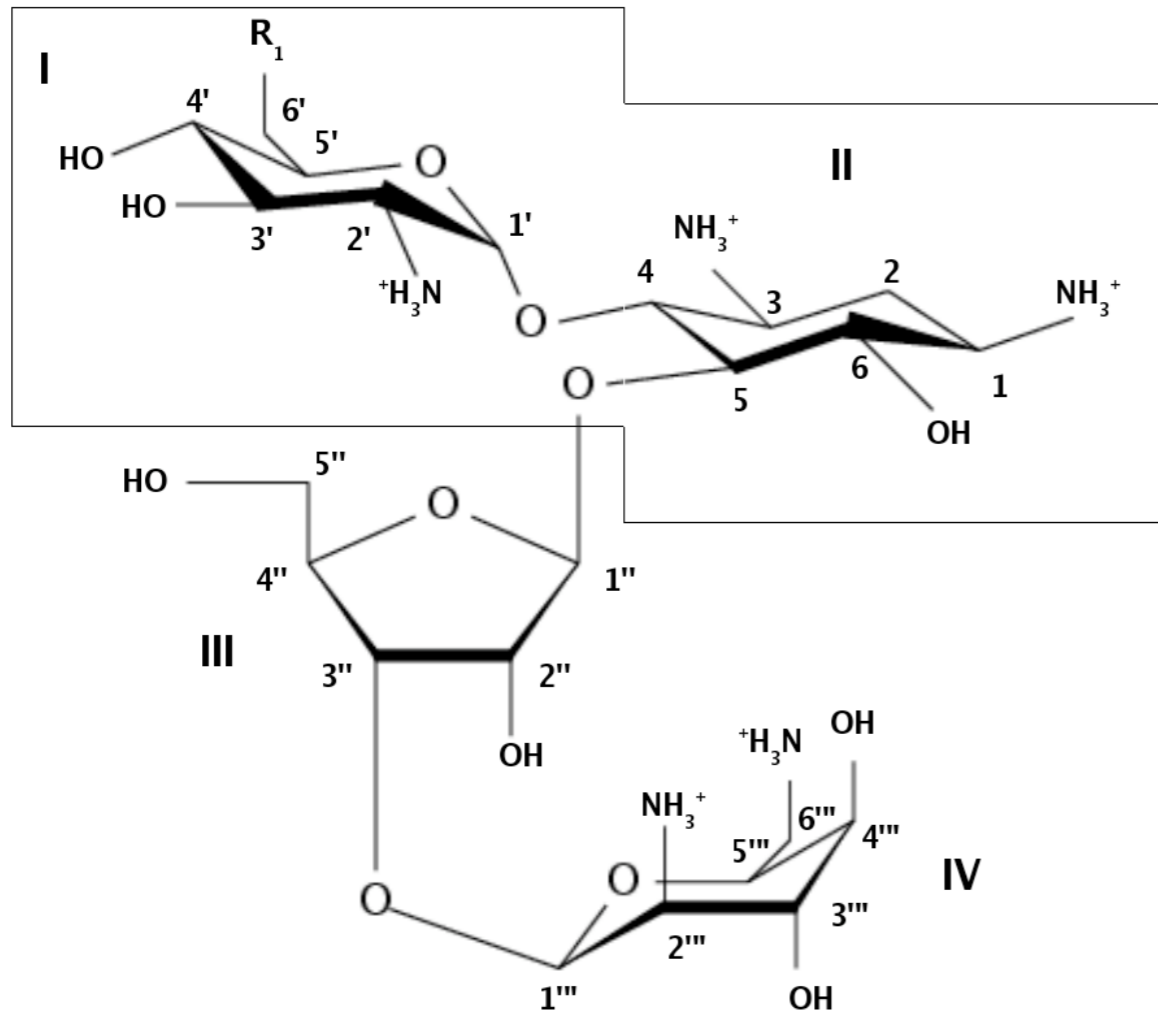
Antybiotyki aminoglikozydowe



wiążą się do **16S RNA** w małej podjednostce rybosomu



Struktura aminoglikozydów

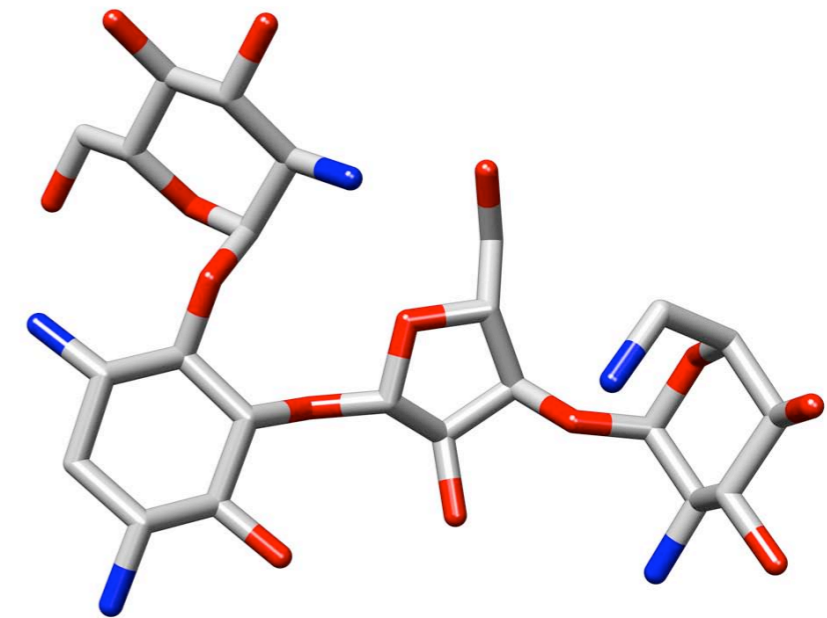


Neamina: I+II, R₁=NH₃⁺

Rybostamycyna: I+II+III, R₁=NH₃⁺

Neomycyna: I+II+III+IV, R₁=NH₃⁺

Paromomycyna: I+II+III+IV, R₁=OH



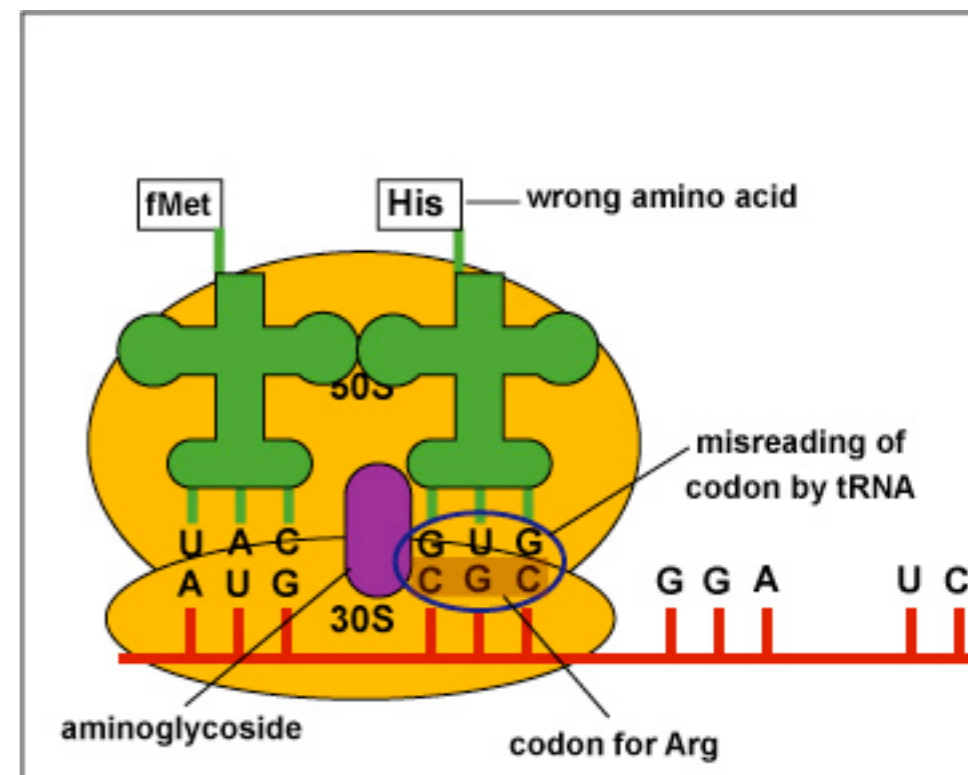
dodatnio naładowane w pH 7



Antybiotyki aminoglikozydowe

Wady:

- toksyczne
- słaba przepuszczalność przez błony
- umiarkowane powinowactwo
- nie wystarczająca specyficzność
- oporność bakterii



Zalety:

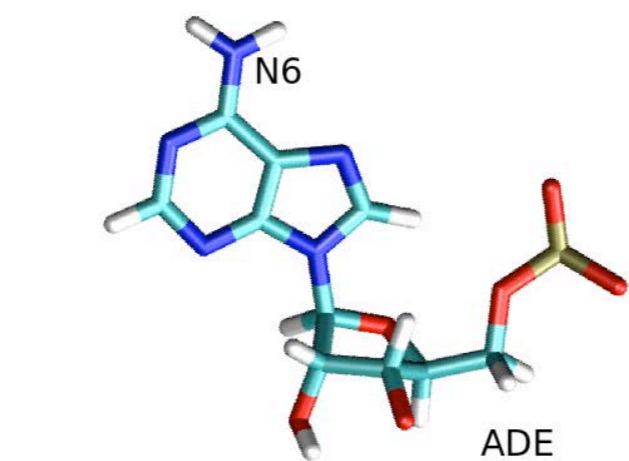
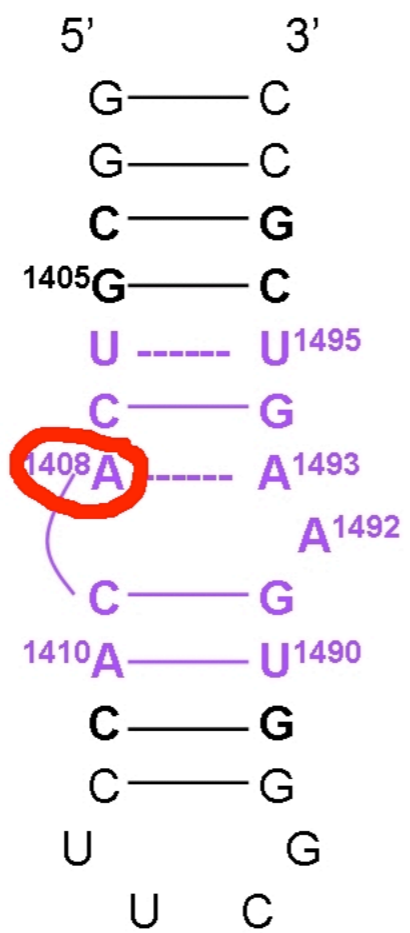
- szerokie spektrum działania
- skuteczne przy ciężkich zakażeniach

<http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/lecguid/unit1/prostruct/antibiotics/antibio2.html>

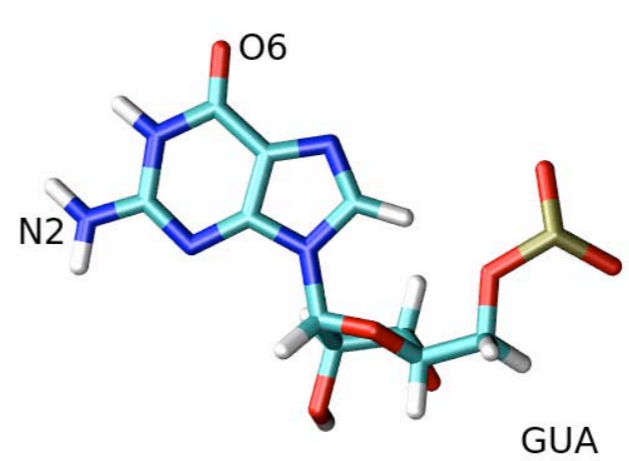
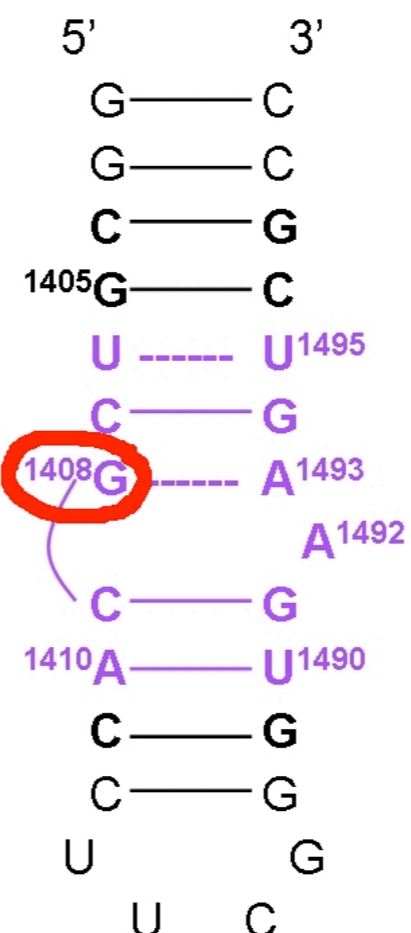


Sekwencja 16S RNA

Prokaryota



Eukaryota

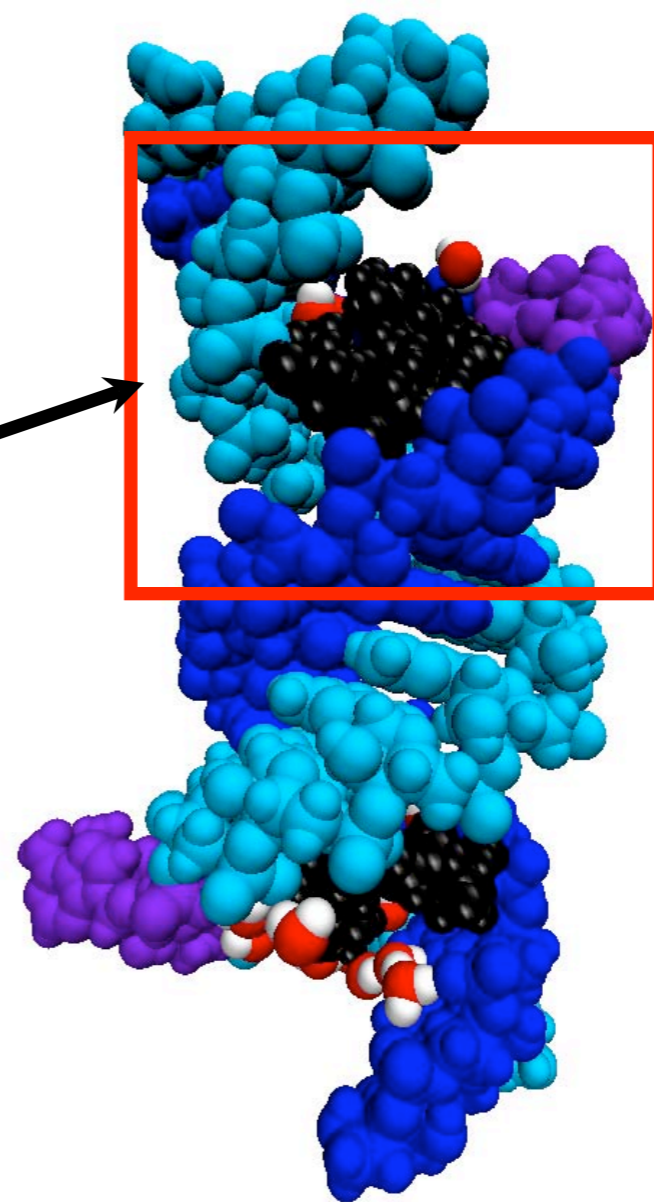
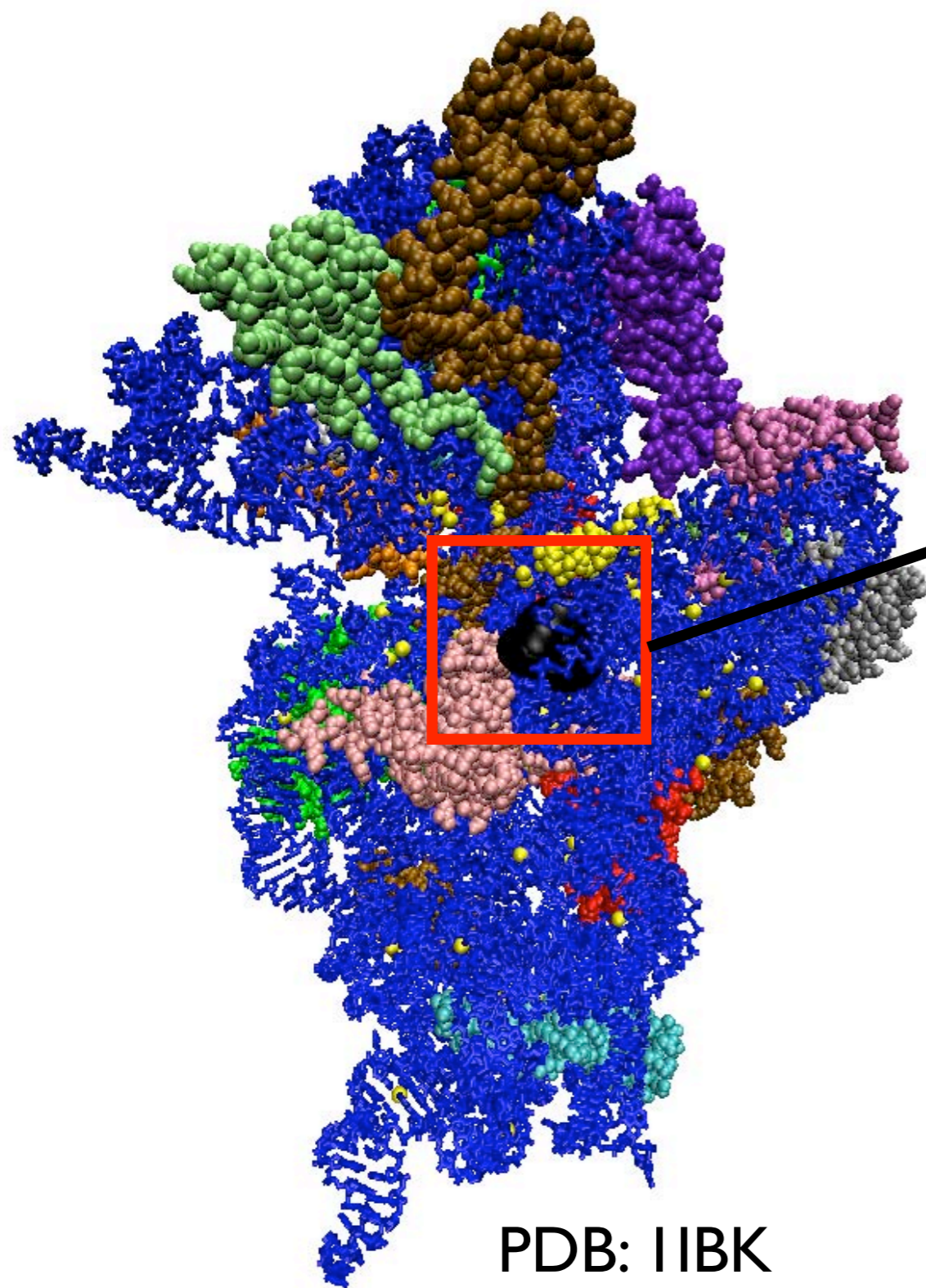


Cel badań

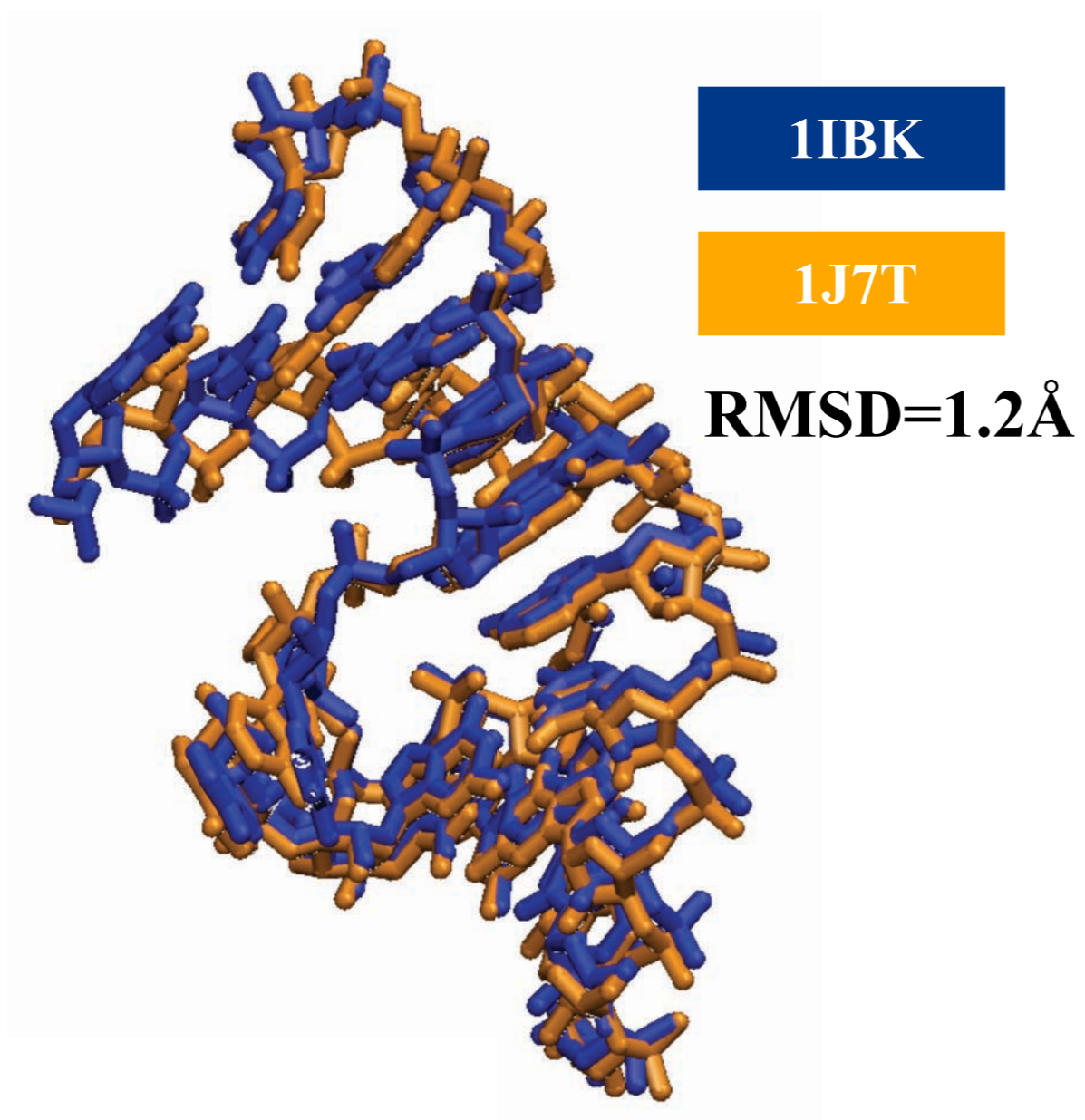
- zbadanie dynamiki miejsca wiążącego i wpływu mutacji A1408G



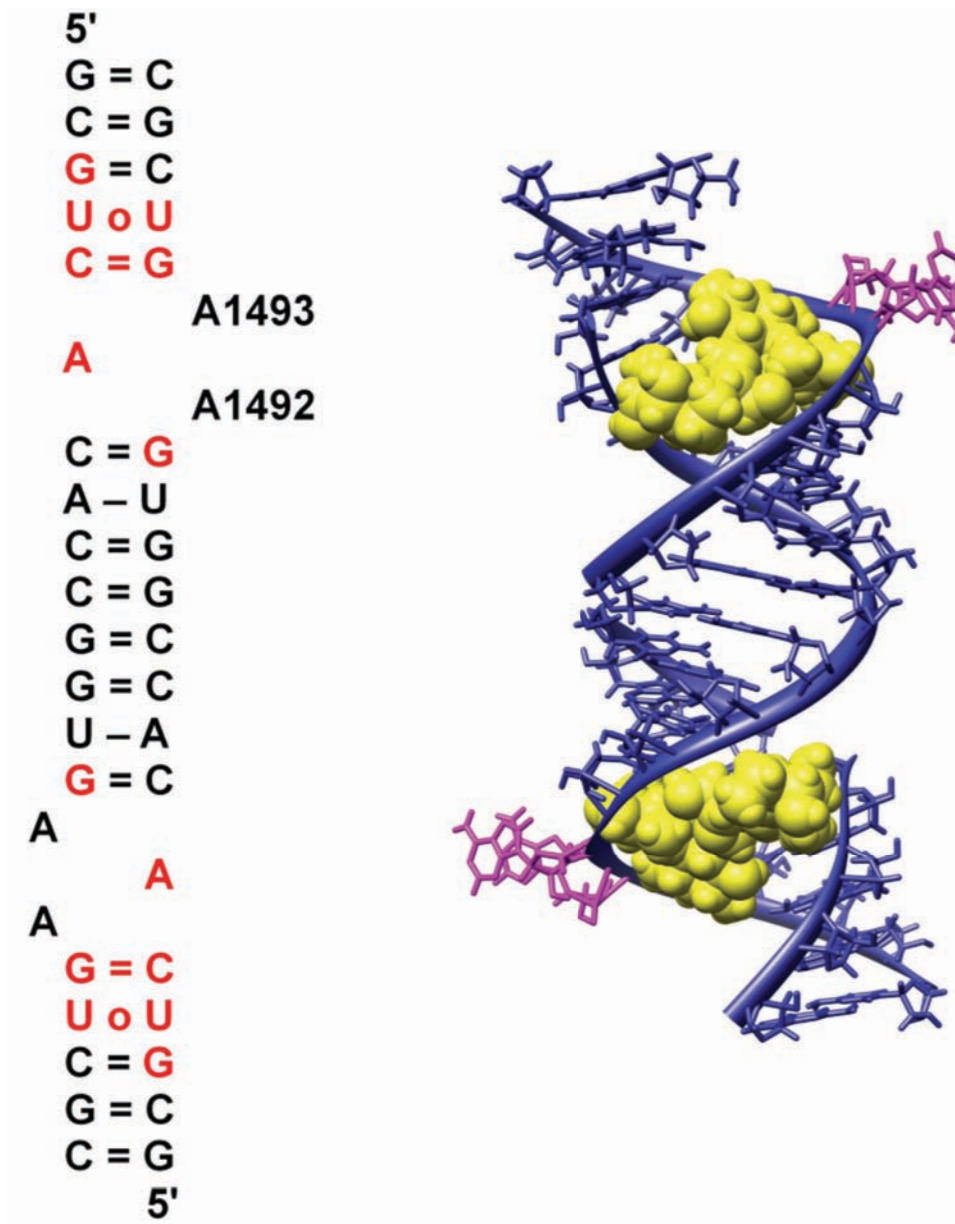
Model miejsca A



Miejsce A



Dupleks RNA

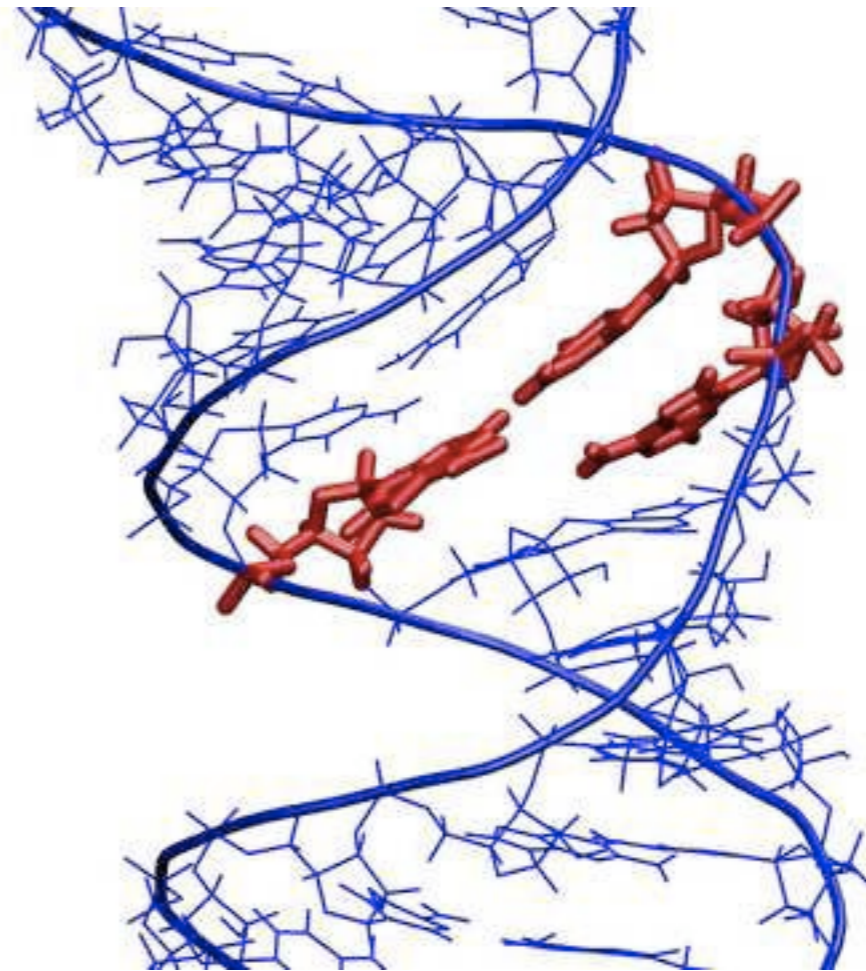
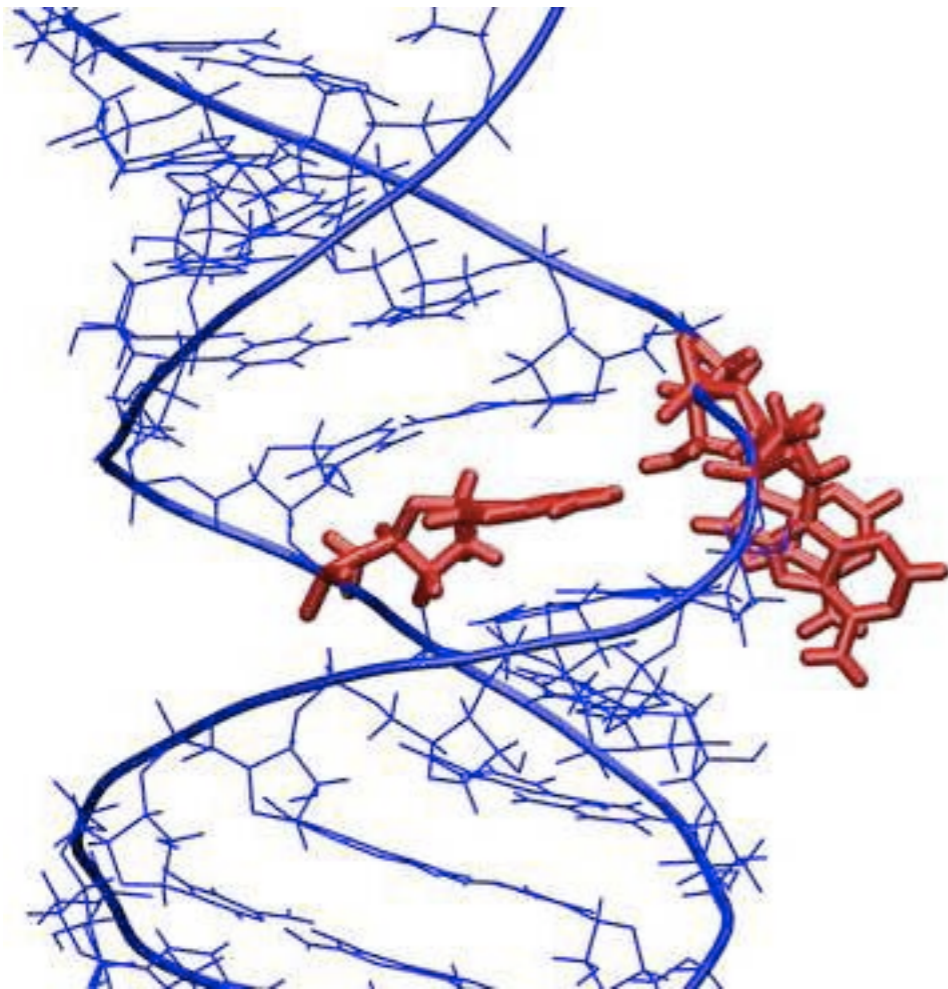


20 ns MD:

- pola siłowe Charmm i Amber
- woda + jony
- str. natywne i w kompleksie
- A1408 i G1408



Mobilność Al492 i Al493



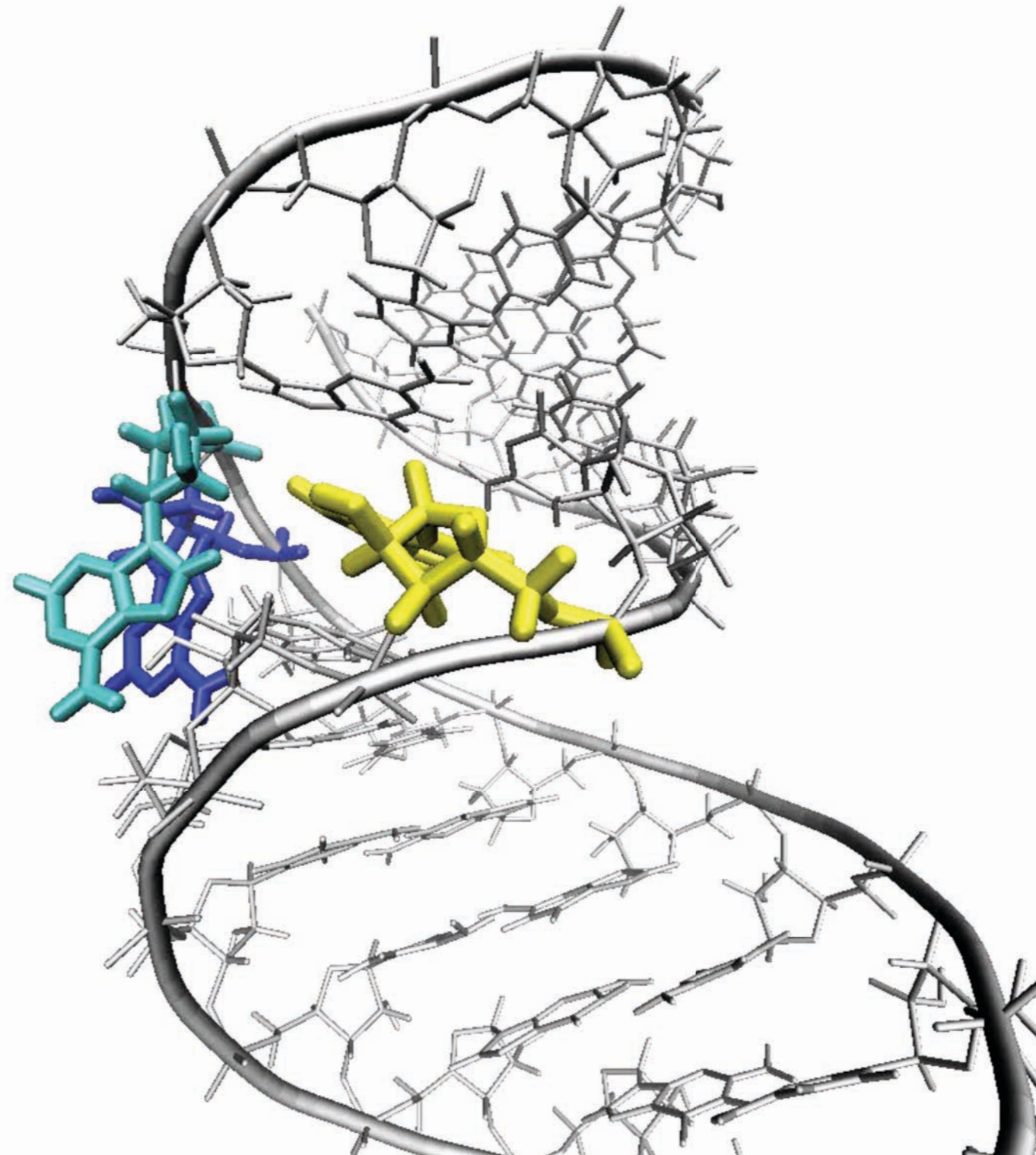
J. Romanowska, P. Setny, J. Trylska, J. Phys. Chem. B, 2008



Mobilność adenin

A1493

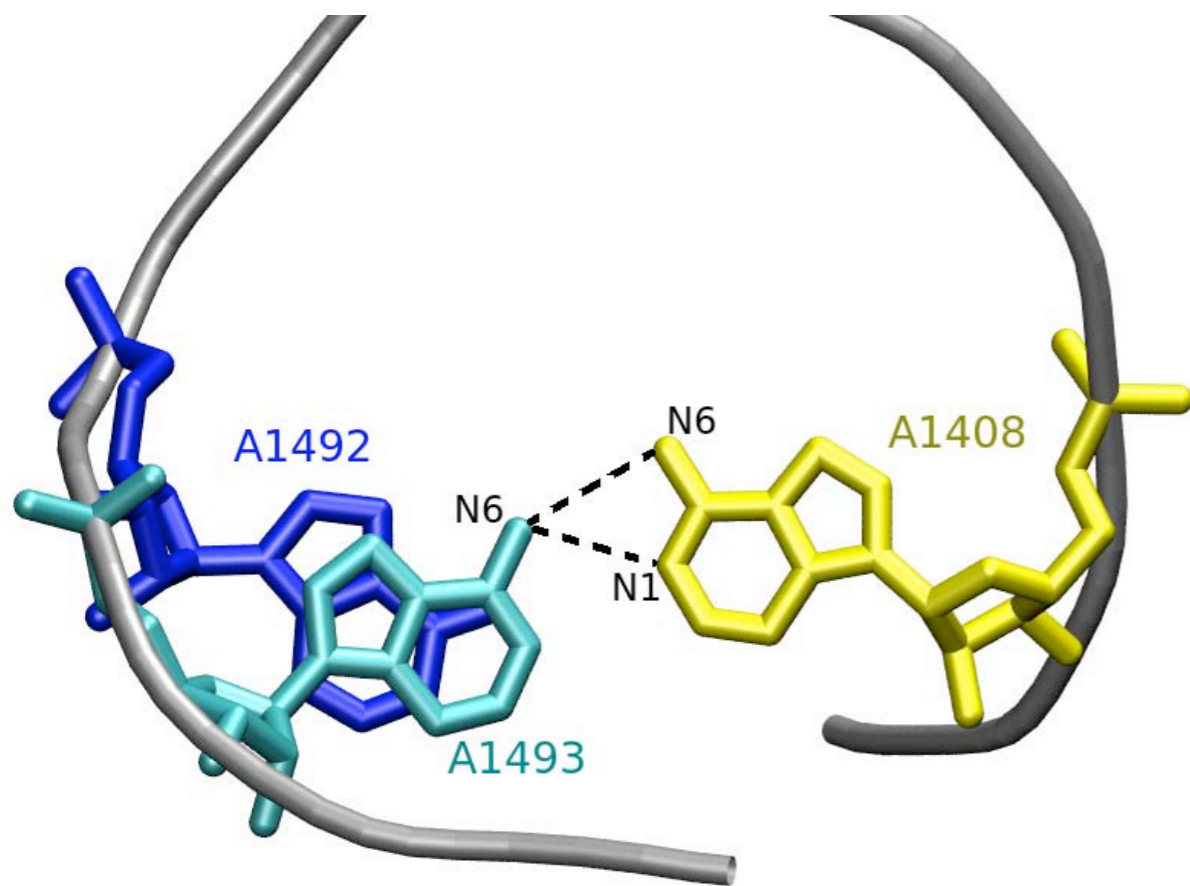
A1492



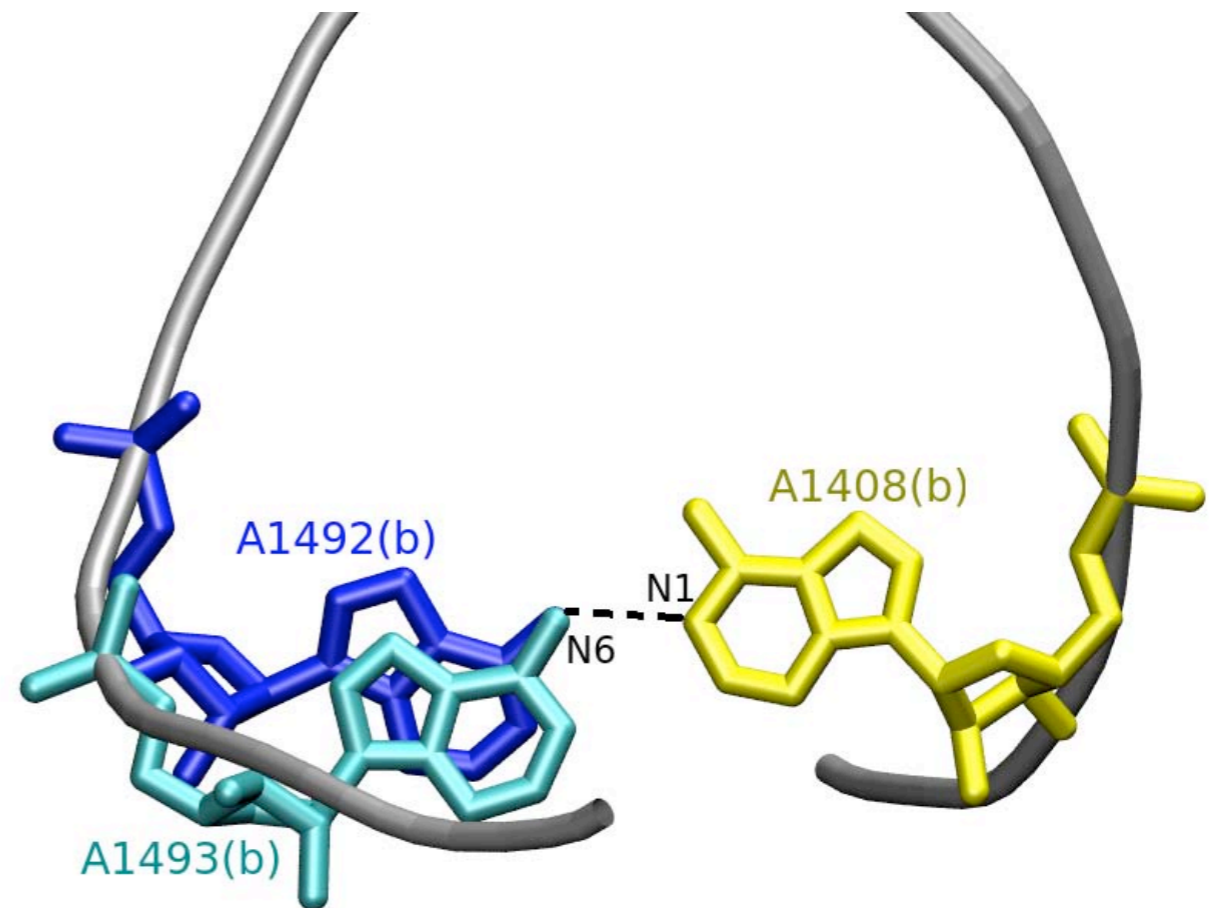
A1408



Porównanie z modelami NMR



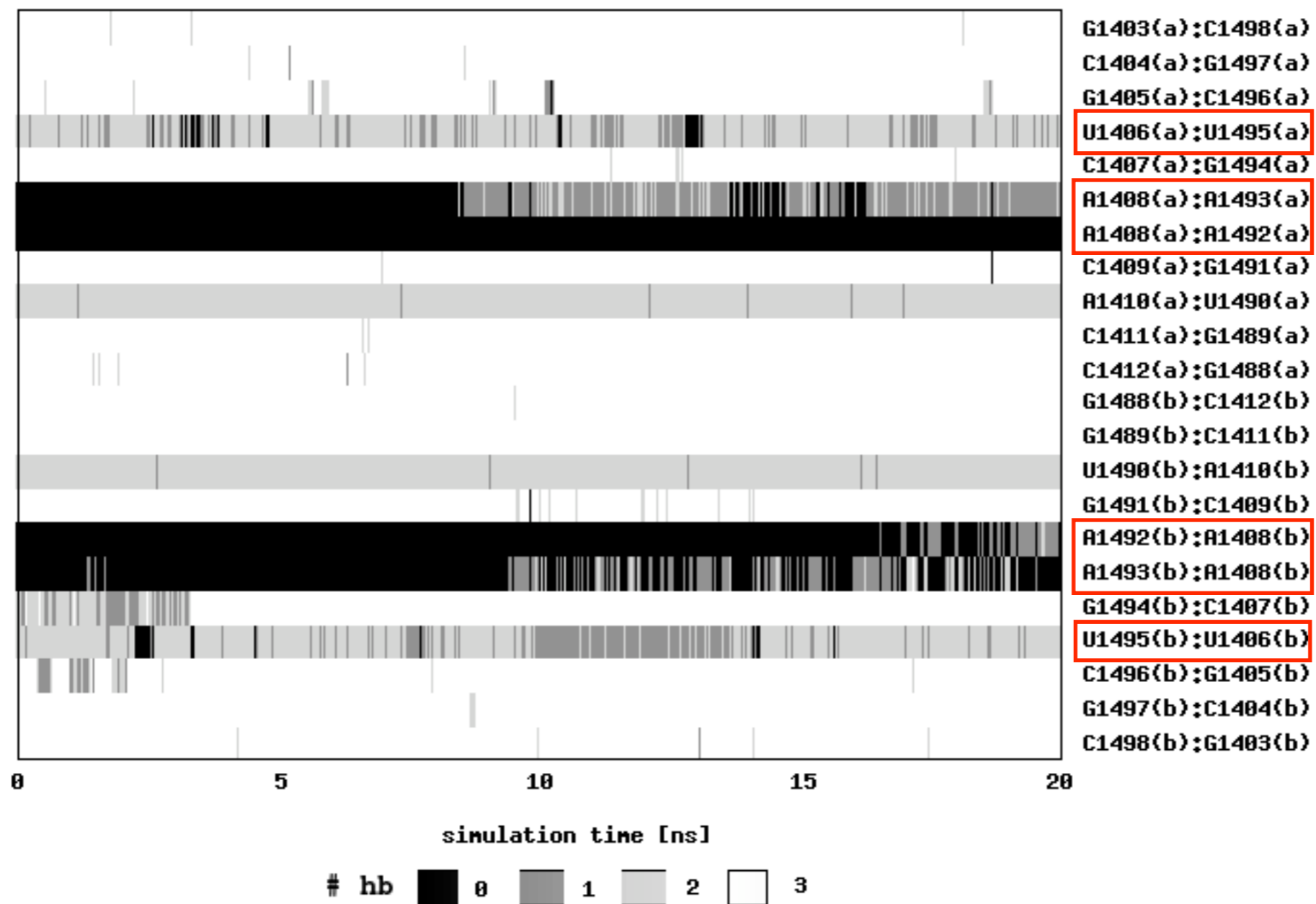
IA3M: model 0



Amber FF

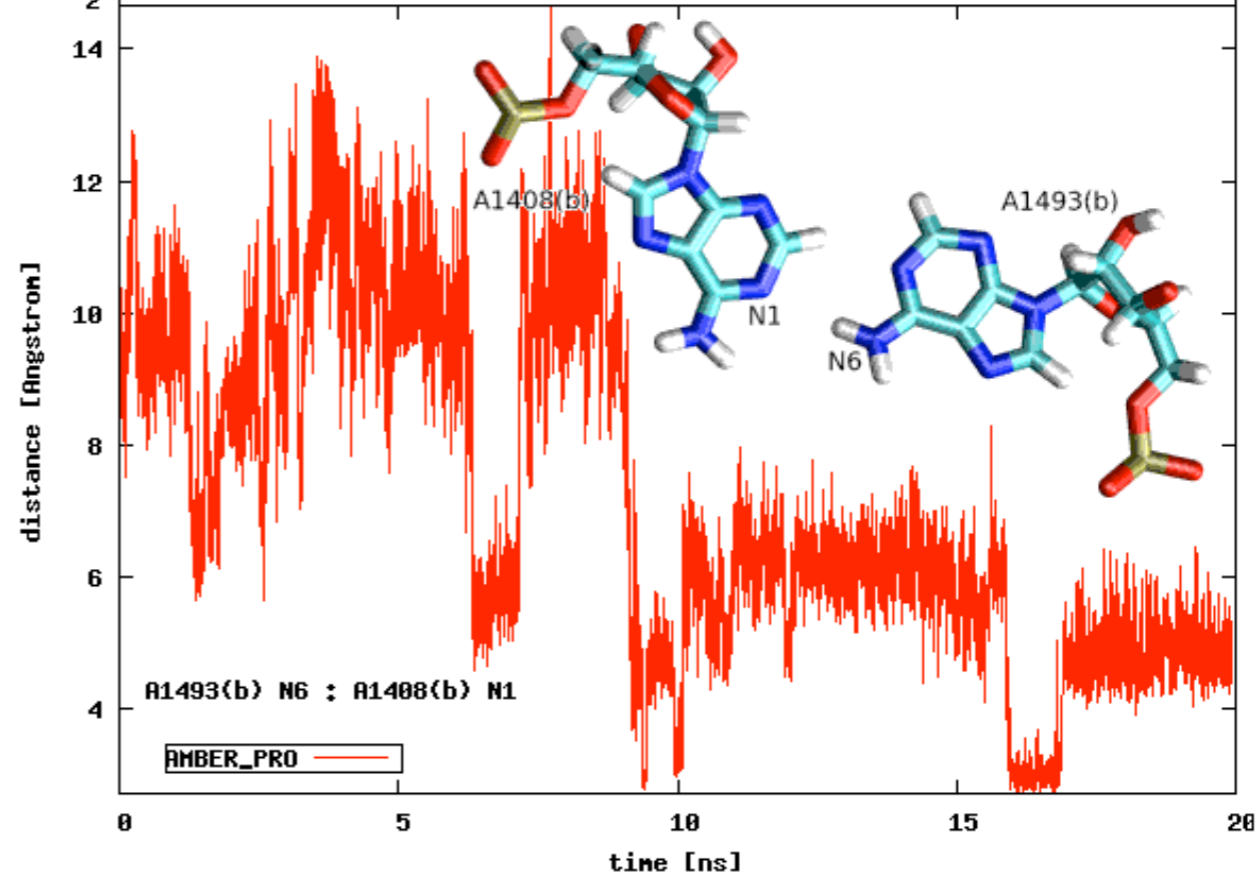
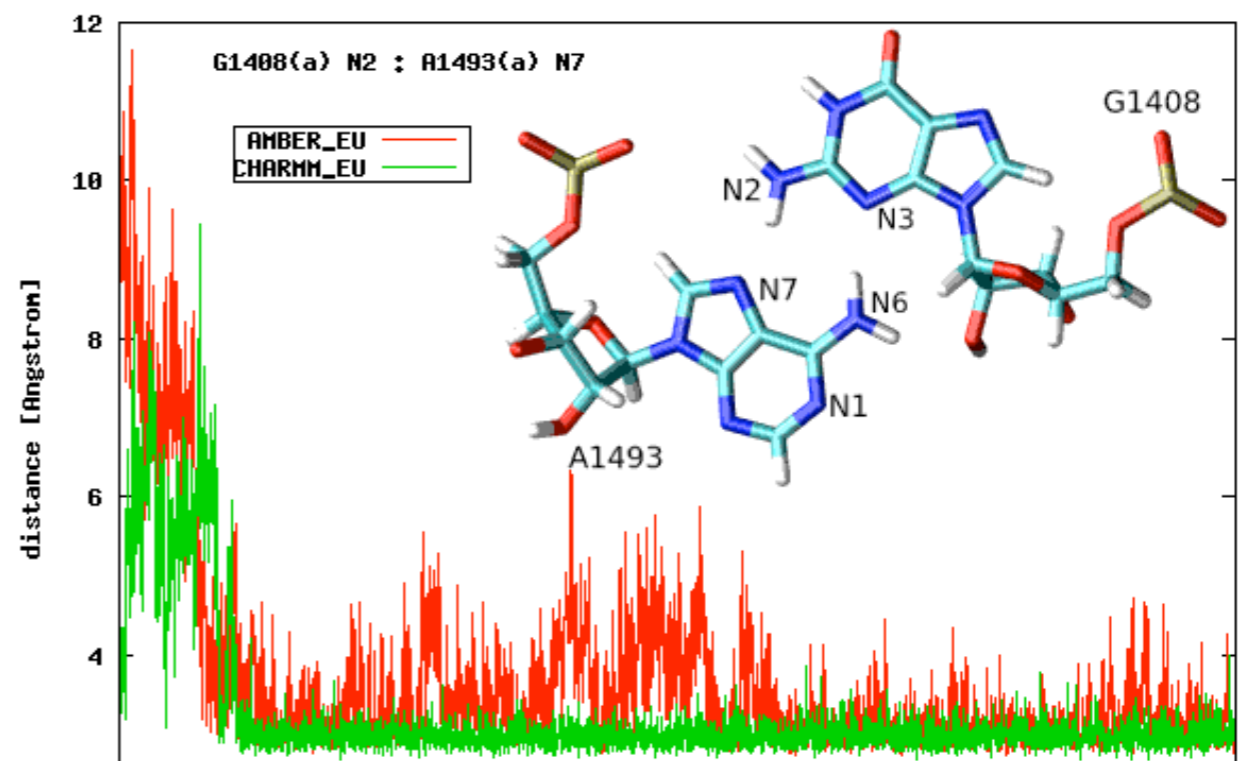
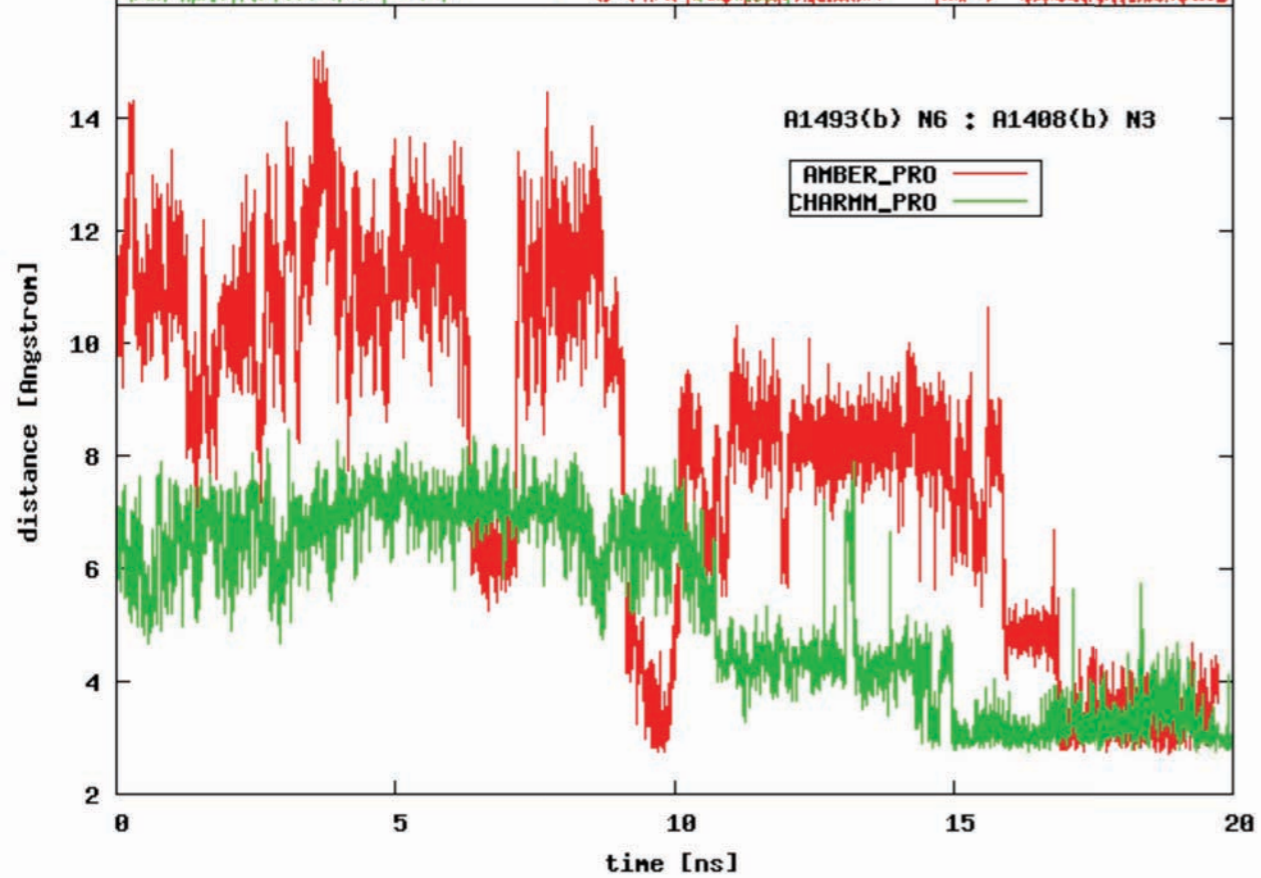
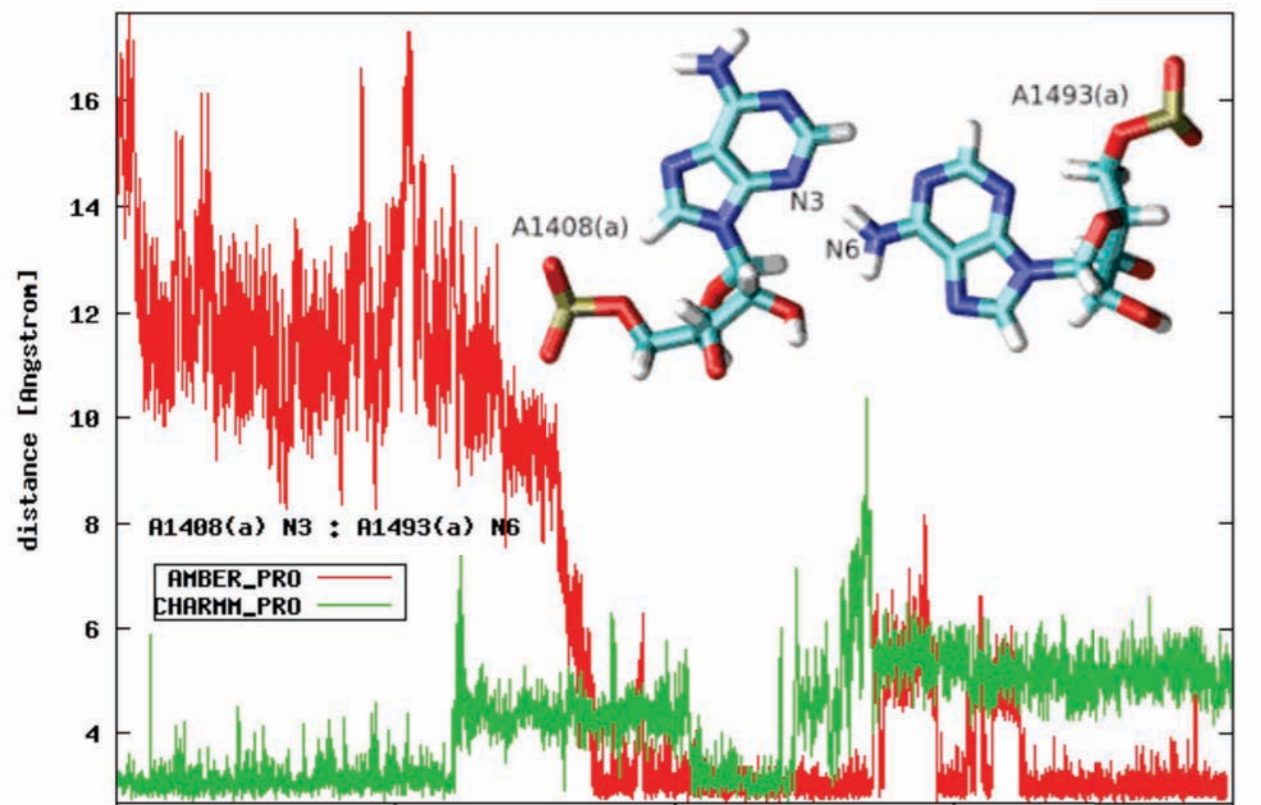


Wiązania wodorowe

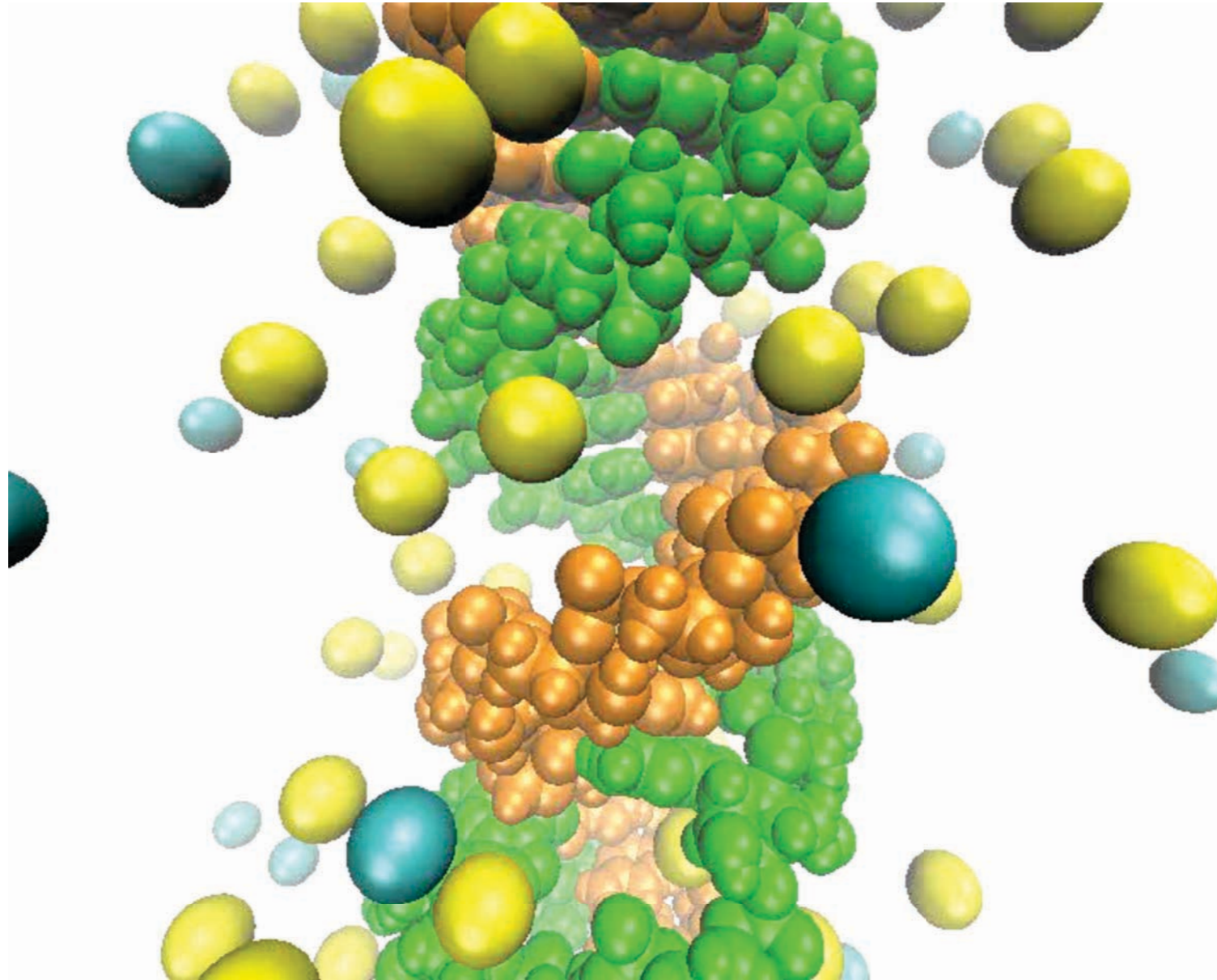


Amber FF, X3DNA





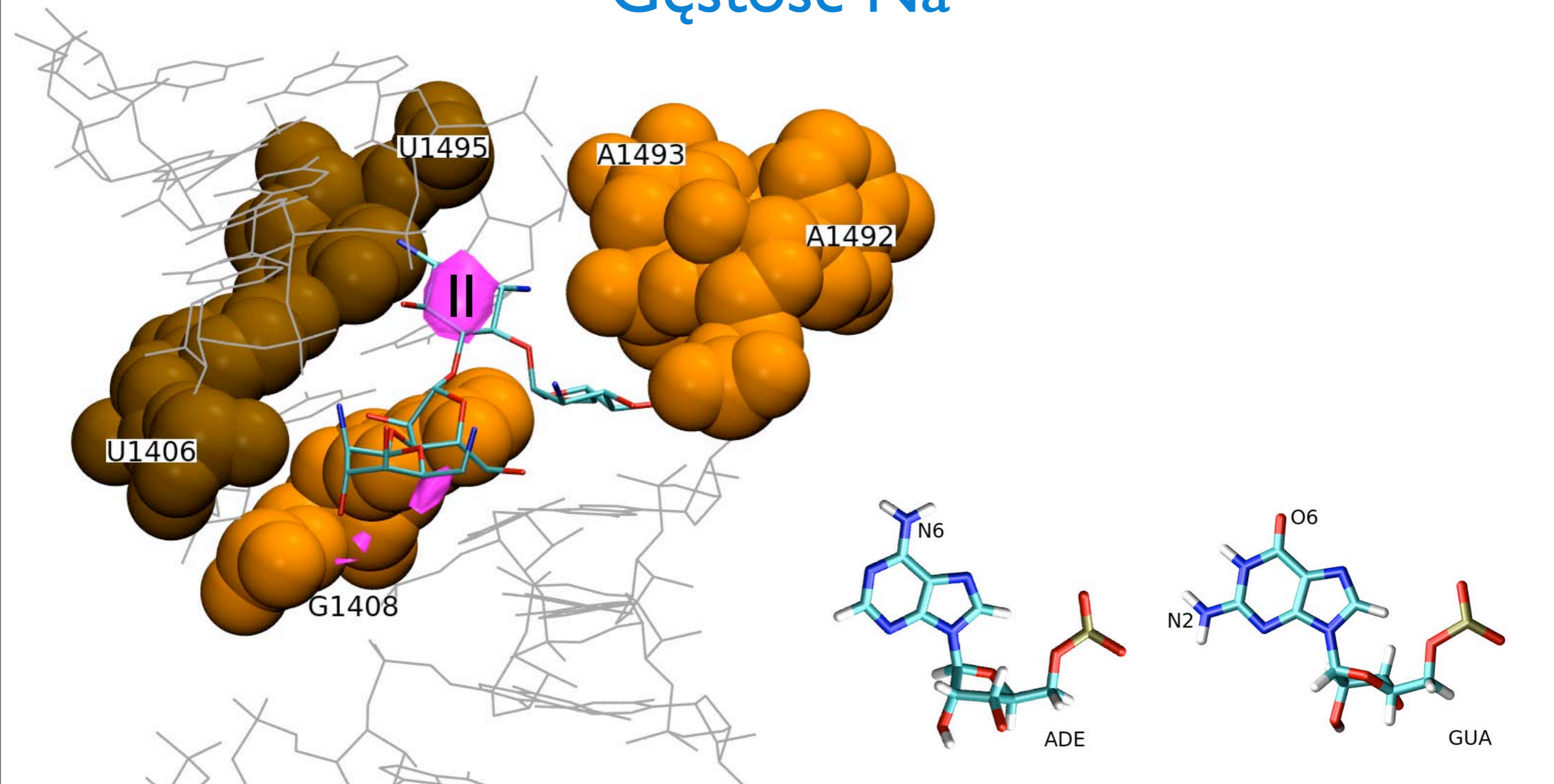
Trajektorija



Na^+ Cl^-



Gęstość Na^+



gęstość jonów ≥ 0.053 jonów na \AA^3



Dynamika molekularna

- A1492 i A1493 wchodzą do wewnątrz i na zewnątrz helisy (razem i osobno)
- Konfiguracje adenin odpowiadają strukturom NMR i krystalograficznym
- Sieć wiązań wodorowych we wnętrzu RNA sugeruje, że w strukturze eukariotycznej oddziaływania są bardziej stabilne
- Mutacja A1408G zmienia rozkład Na^+ w miejscu wiążącym

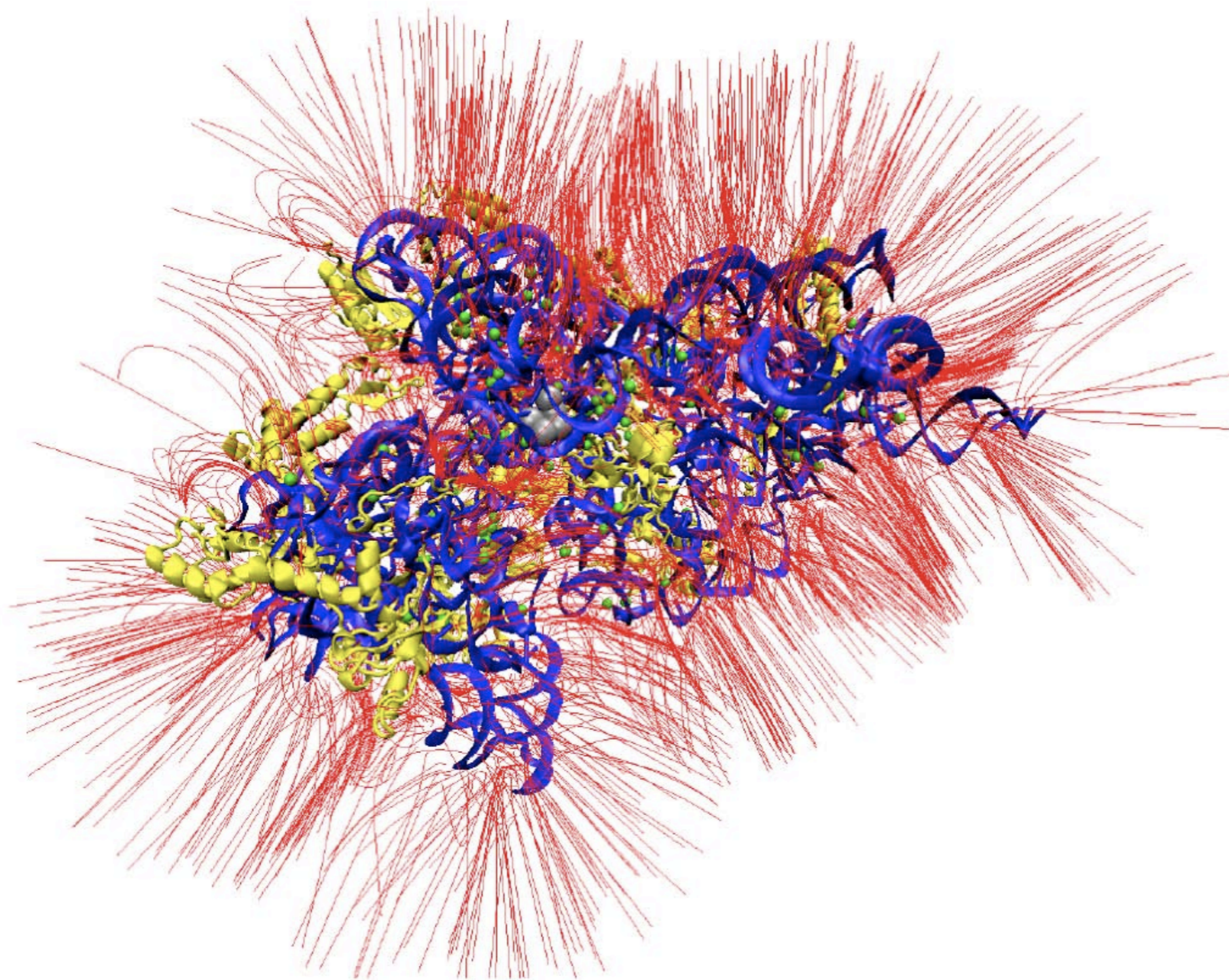


Proces asocjacji antybiotyku

- Jakie są pierwsze etapy wiązania?
- Jak elektrostatyka wpływa na asocjacje?
- Czy można stosować dynamikę brownowską do kwasów nukleinowych?
- Jakie są stałe asocjacji wiązania?



Podjednostka 30S



linie sił pola elektrostatycznego RNA białka 30S



Dynamika Brownowska

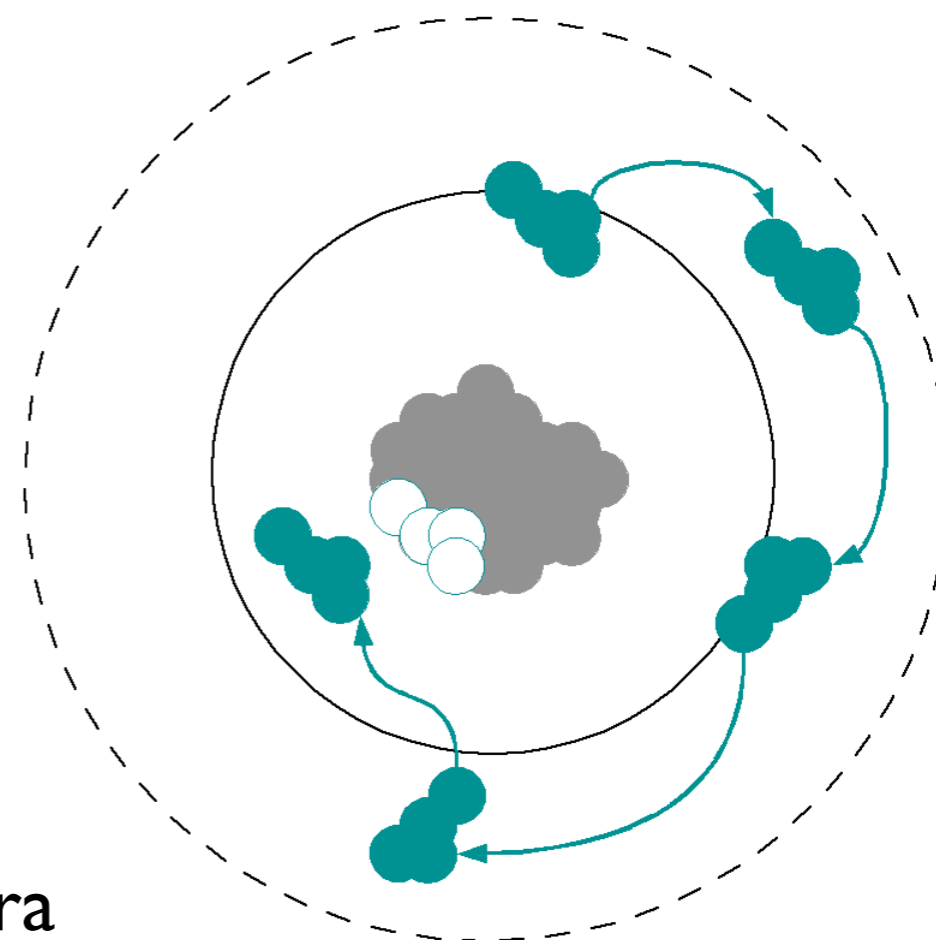
$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \frac{D}{k_b T} \mathbf{F}(t) \Delta t + \mathbf{R}(t)$$

Aplikacje:

- symulacje dyfuzyjnego ruchu oddziałujących molekuł
- obliczenia stałych szybkości asocjacji

Podstawy:

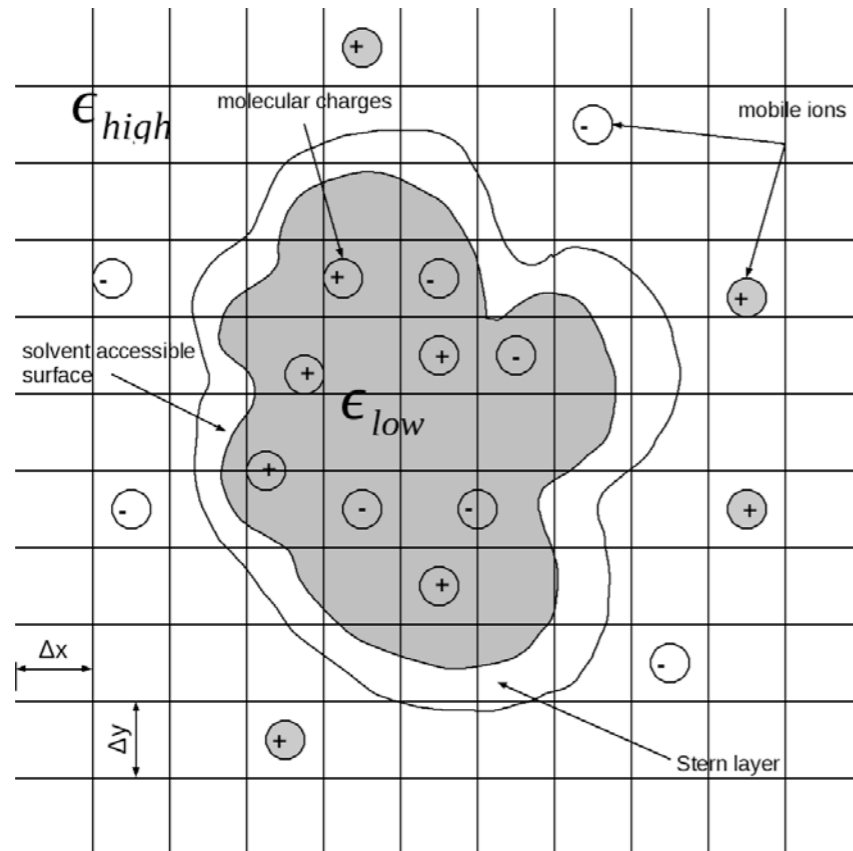
- mezoskopowy model solwentu
- ruch ligandu w polu elektrostatycznym receptora
- siły międzycząsteczkowe: elektrostatyka + excluded volume



$$\langle R_i \rangle = 0 \quad \langle R_i R_j \rangle = 2D_{ij} \Delta t$$

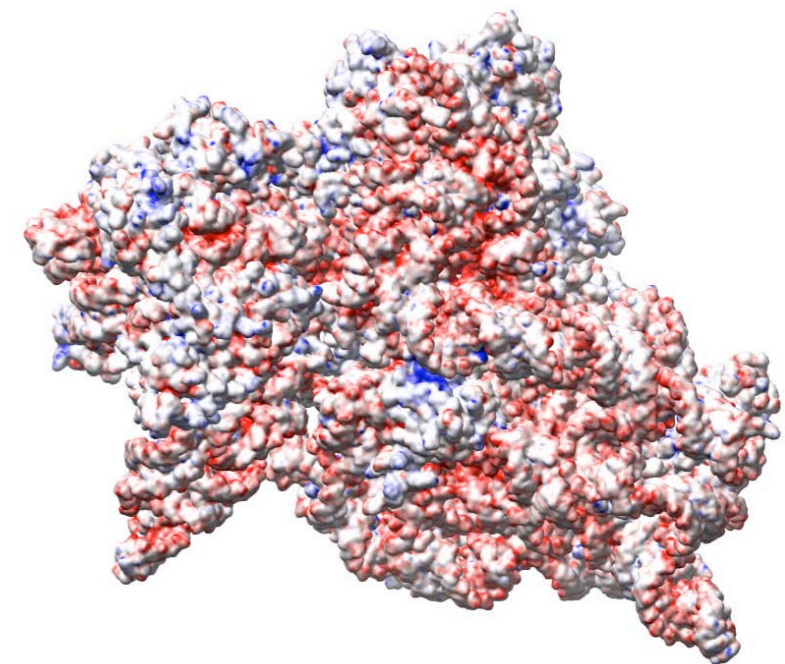
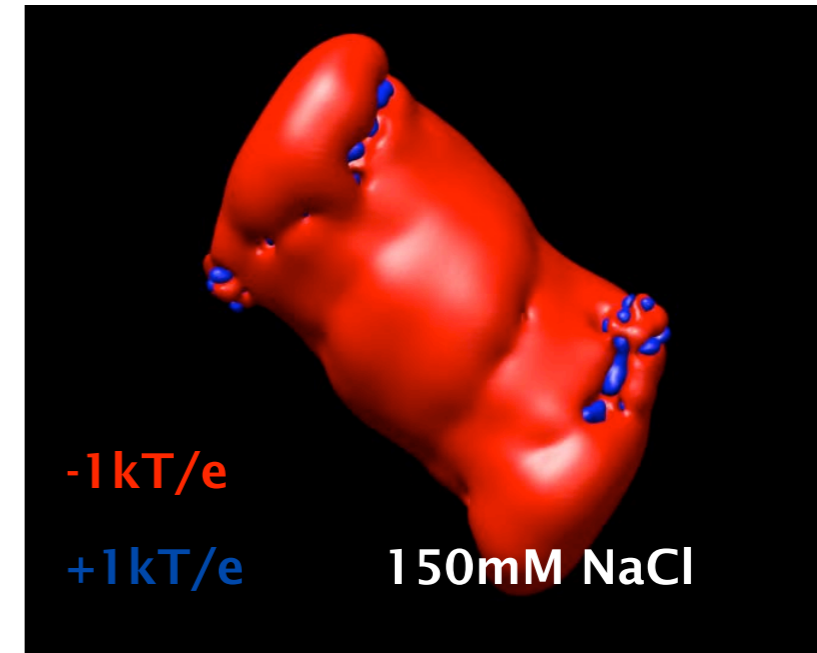


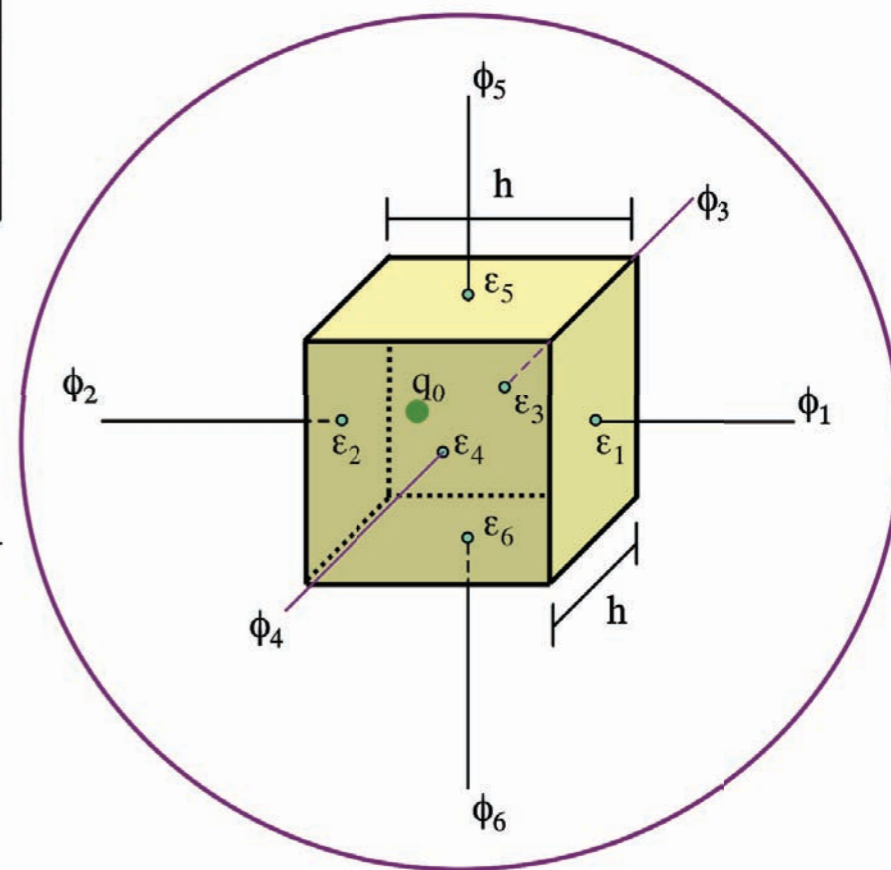
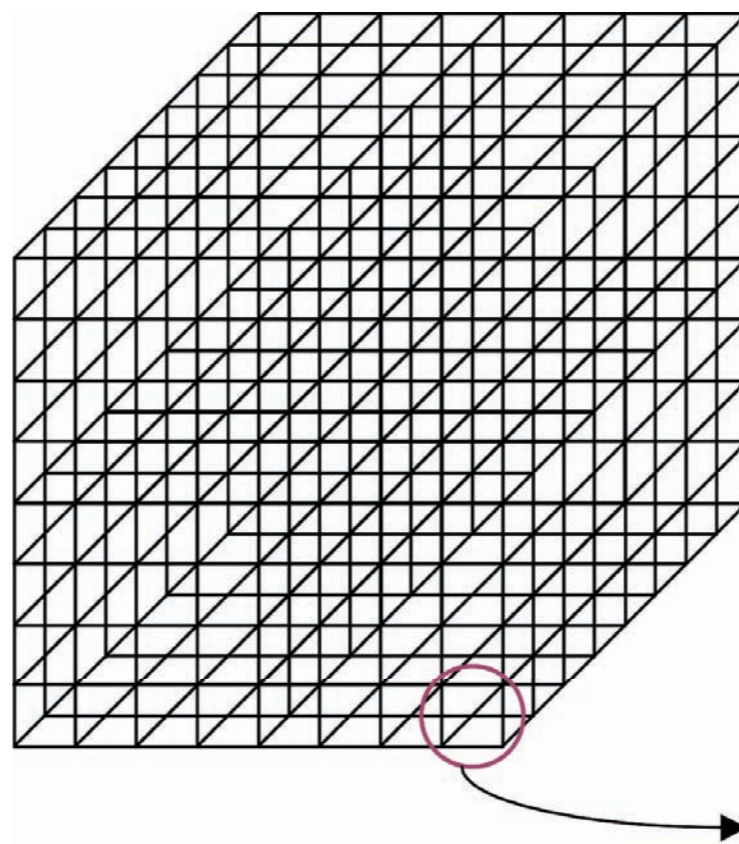
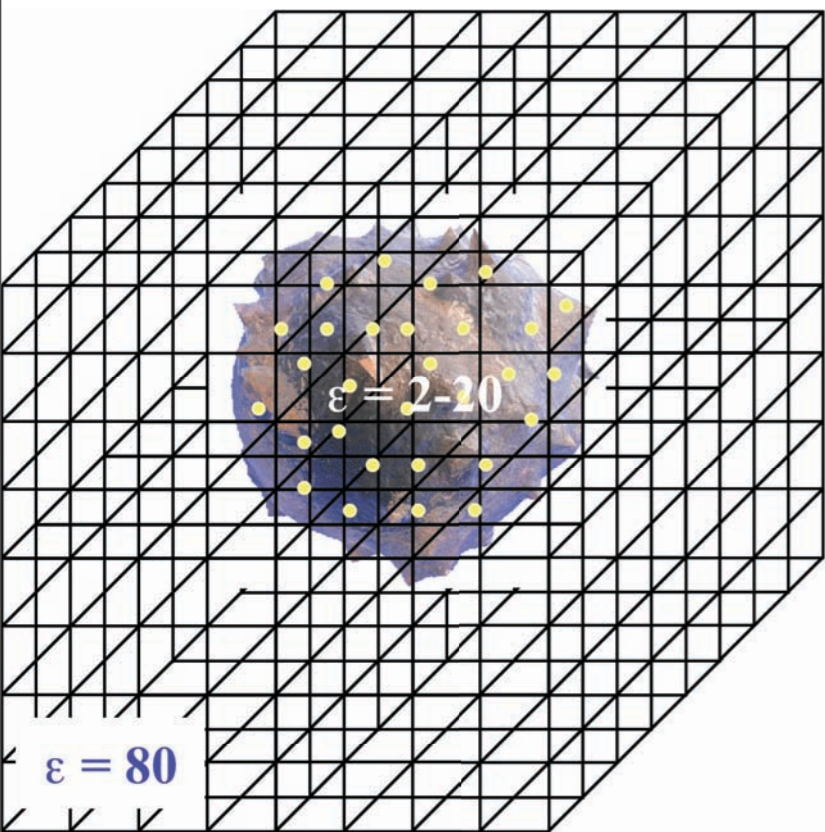
Model Poissona-Boltzmann



$$\nabla \epsilon(\vec{r}) \nabla \psi(\vec{r}) + 4\pi [\rho(\vec{r}) + \rho^{ion}(\vec{r})] = 0$$

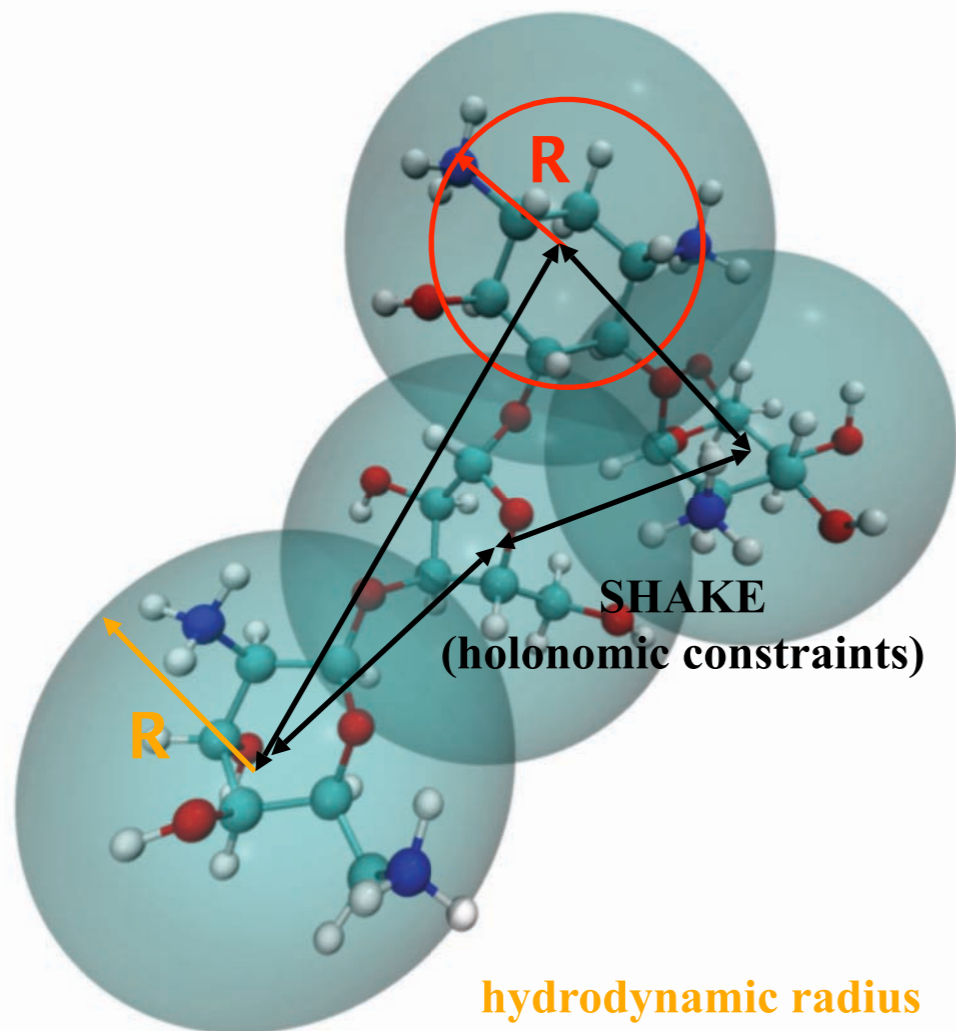
$$\rho^{ion}(\vec{r}) = \sum_i e z_i c_i^b e^{-z_i e \frac{\psi(\vec{r})}{k_B T}}$$





Hydrodynamiczne modele ligandów

exclusion radius



$q=+4e$



neamina

$$D = 4.2 \times 10^{-6} \frac{cm^2}{s}$$

$q=+4e$



rybostamycyna

$$D = 3.8 \times 10^{-6} \frac{cm^2}{s}$$

$q=+5e$



paromomycyna

$$D = 3.2 \times 10^{-6} \frac{cm^2}{s}$$

$q=+6e$

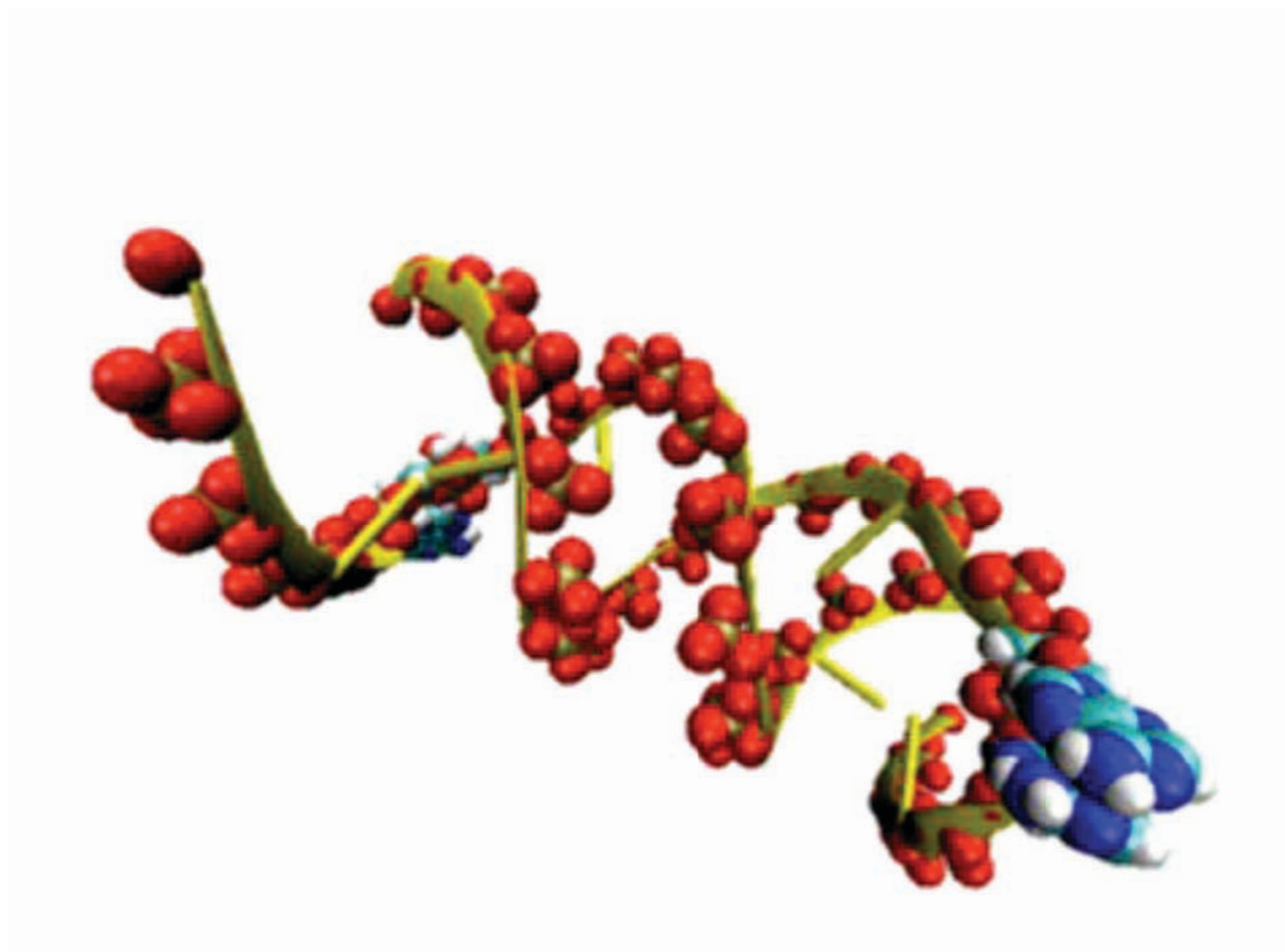


neomycyna

$$D = 3.2 \times 10^{-6} \frac{cm^2}{s}$$



Mechanizm asocjacji paromomycyny

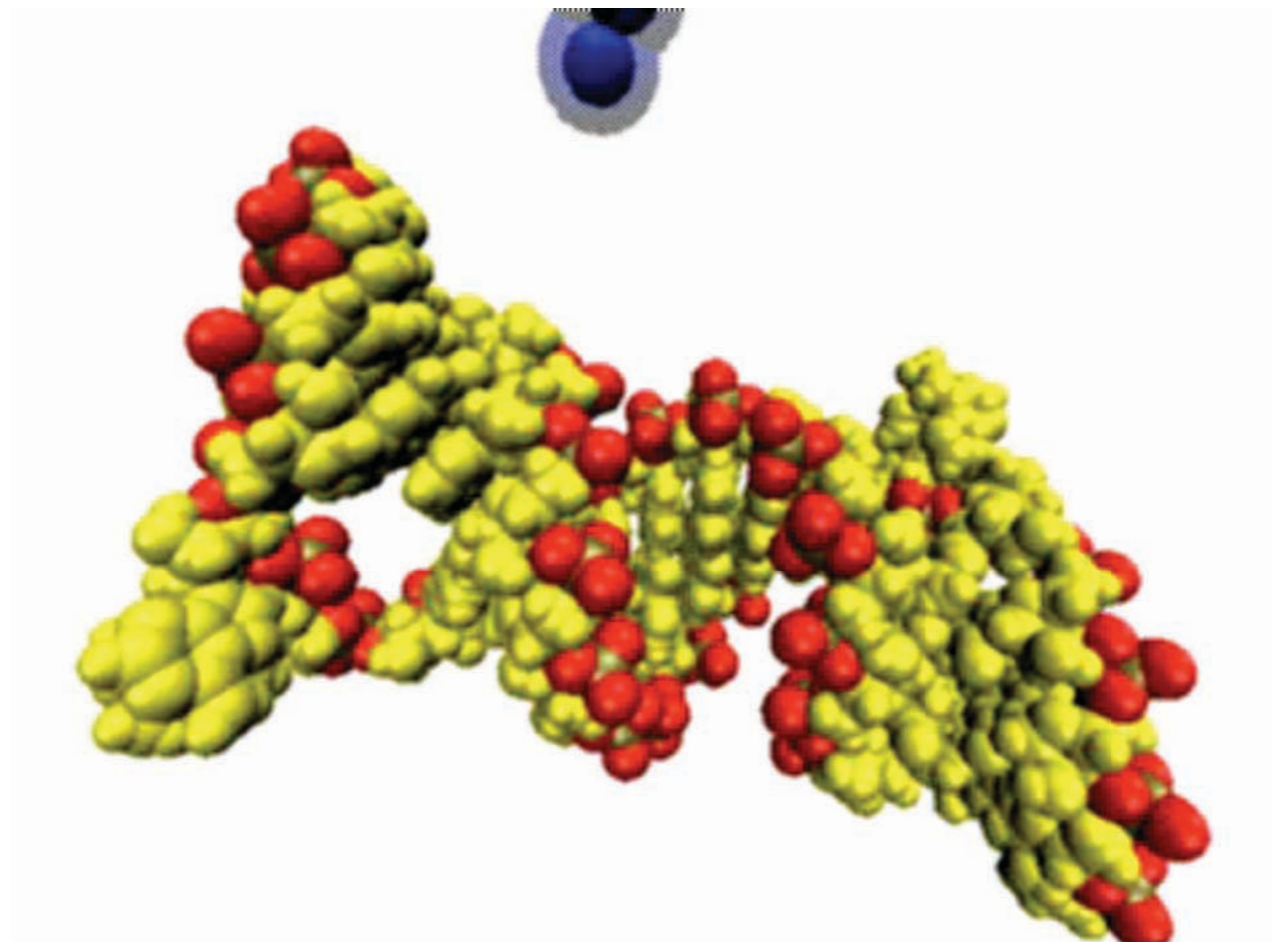


UHBD

średni czas ślizgania - 10 ns na parę zasad (~100 ns pomiędzy miejscami A)



Mechanizm asocjacji



M. Długosz, J. M. Antosiewicz, J. Trylska, JCTC, 2008



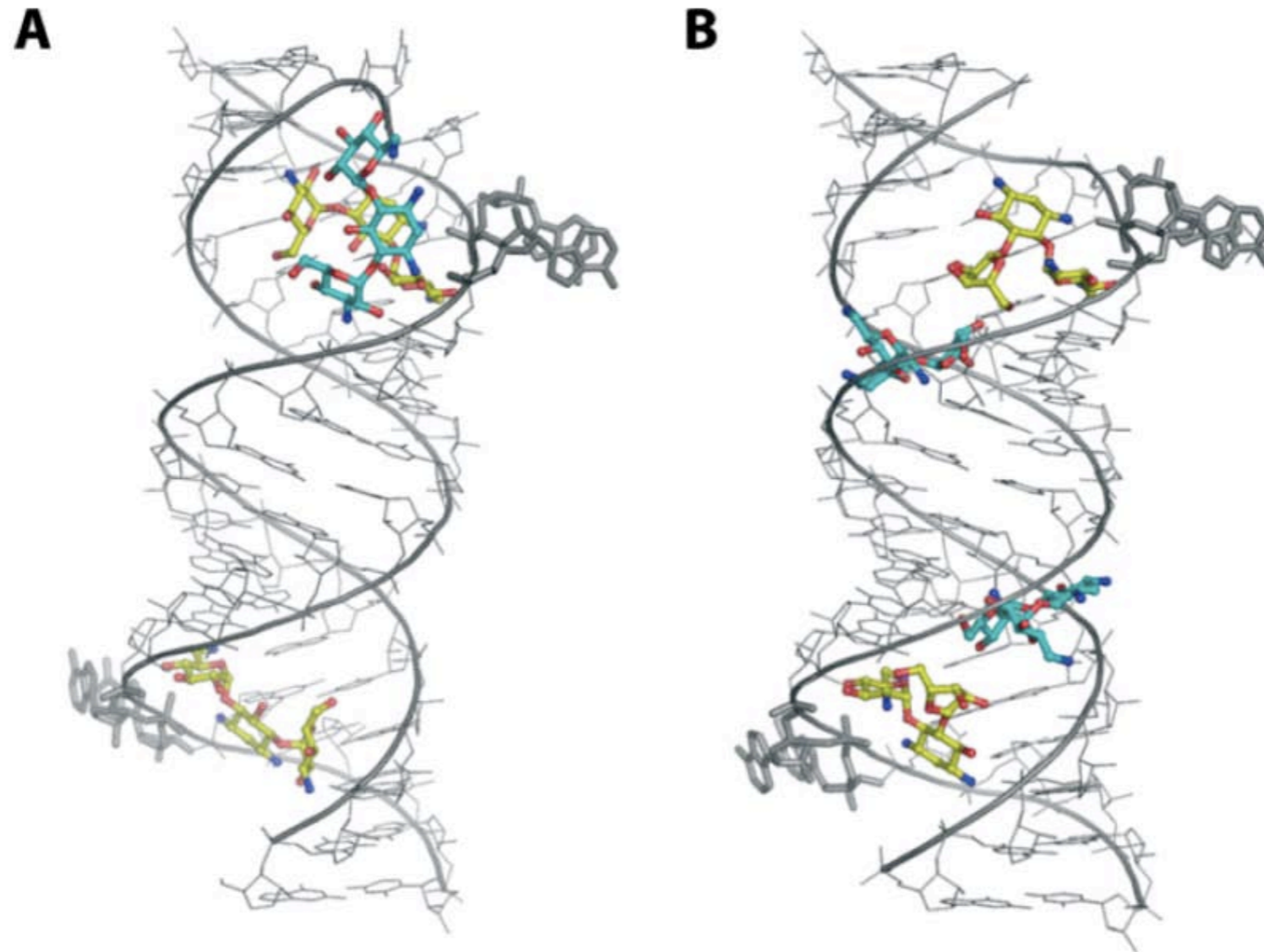
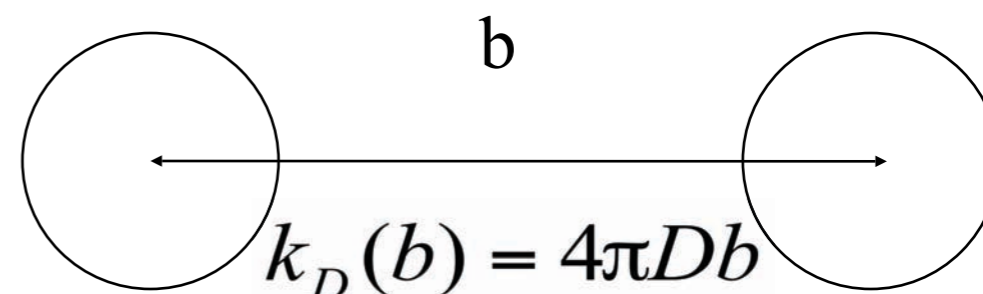


Figure 6. Specific and 'non-specific' binding modes of aminoglycosides. (A) Overall view of crystallized kanamycin A complex. (B) Overall view of crystallized ribostamycin complex. In both structures, the specifically bound antibiotics are coloured in yellow ball and sticks and the 'non-specifically' bound antibiotics are coloured in cyan ball and sticks.



Stałe szybkości reakcji

$$k_{D,b} = k_D(b)\beta^\infty = 4\pi \left[\int_b^\infty \frac{e^{-\frac{U(r)}{k_B T}}}{r^2 D} dr \right]^{-1} \beta^\infty$$



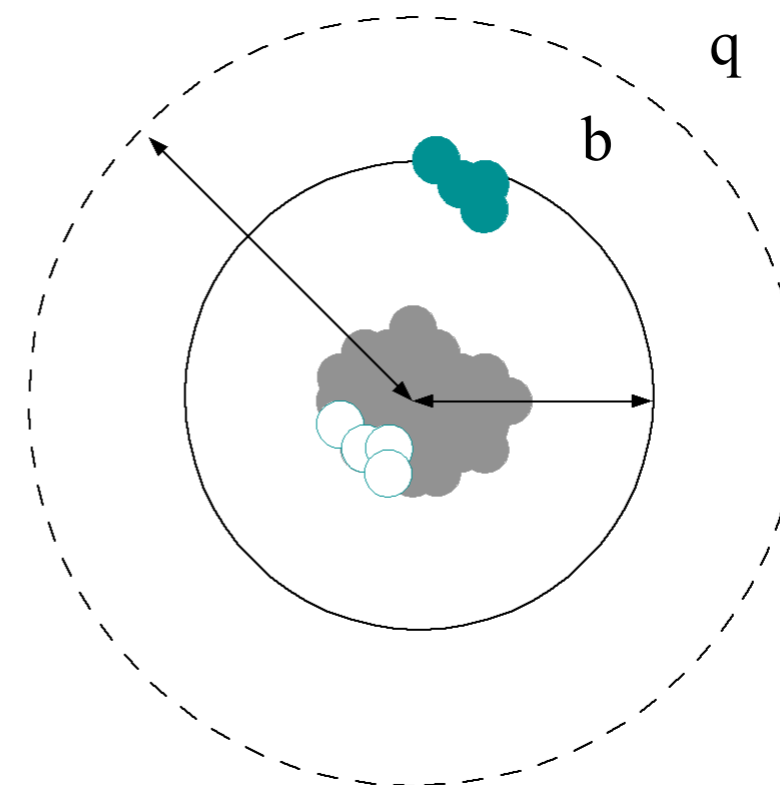
dla nie oddziałujących cząstek

$$\beta^\infty = \frac{\beta}{1 - (1 - \beta)\Omega}$$

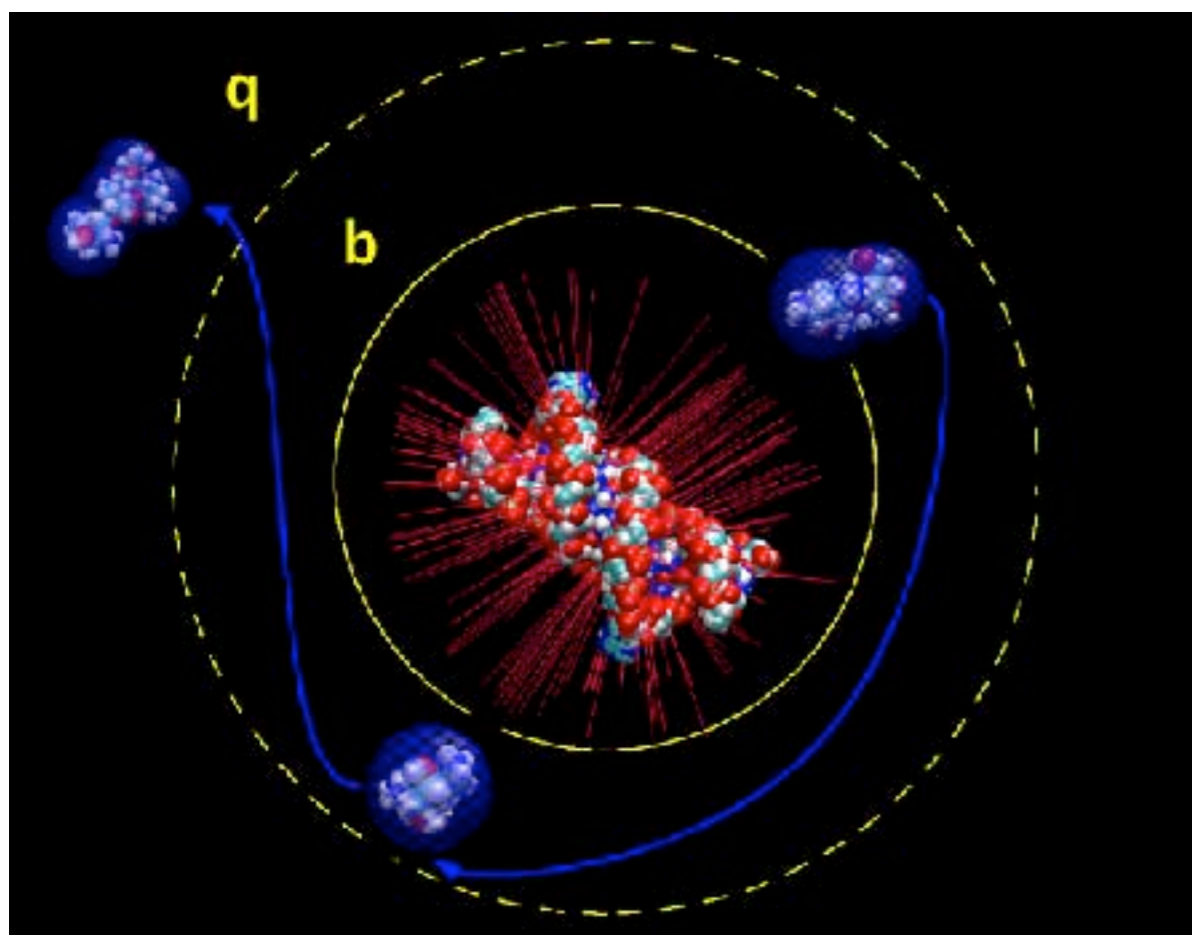
$$\beta = \frac{N^{reactive}}{N}$$

prawdopodobieństwo,
że cząstki utworzą
kompleks spotkaniowy

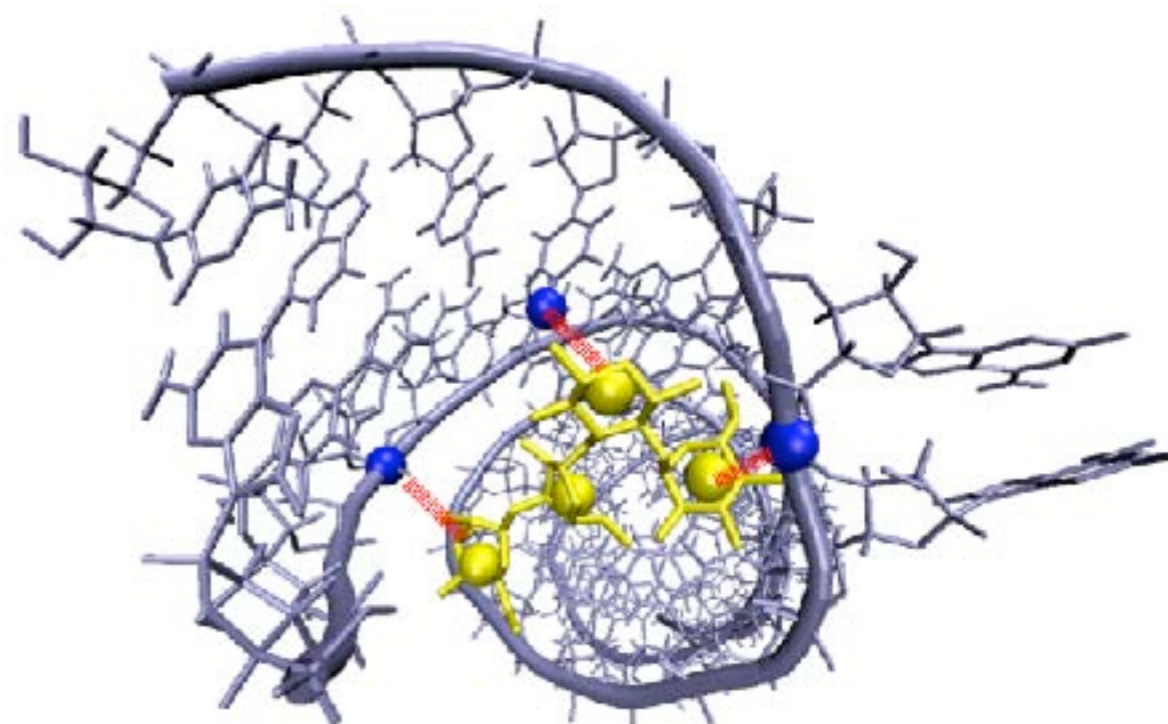
$$\Omega = \frac{k_D(b)}{k_D(q)}$$



Symulacje dynamiki brownowskiej



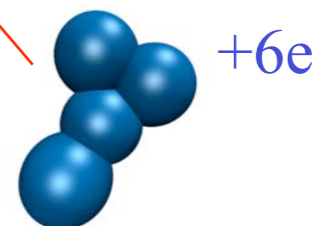
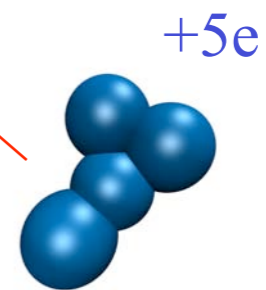
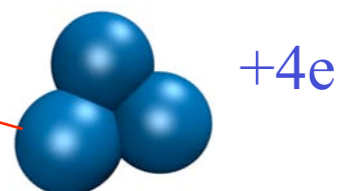
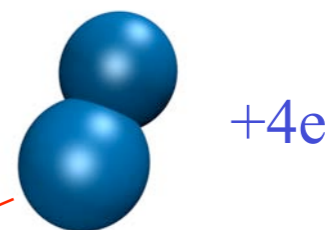
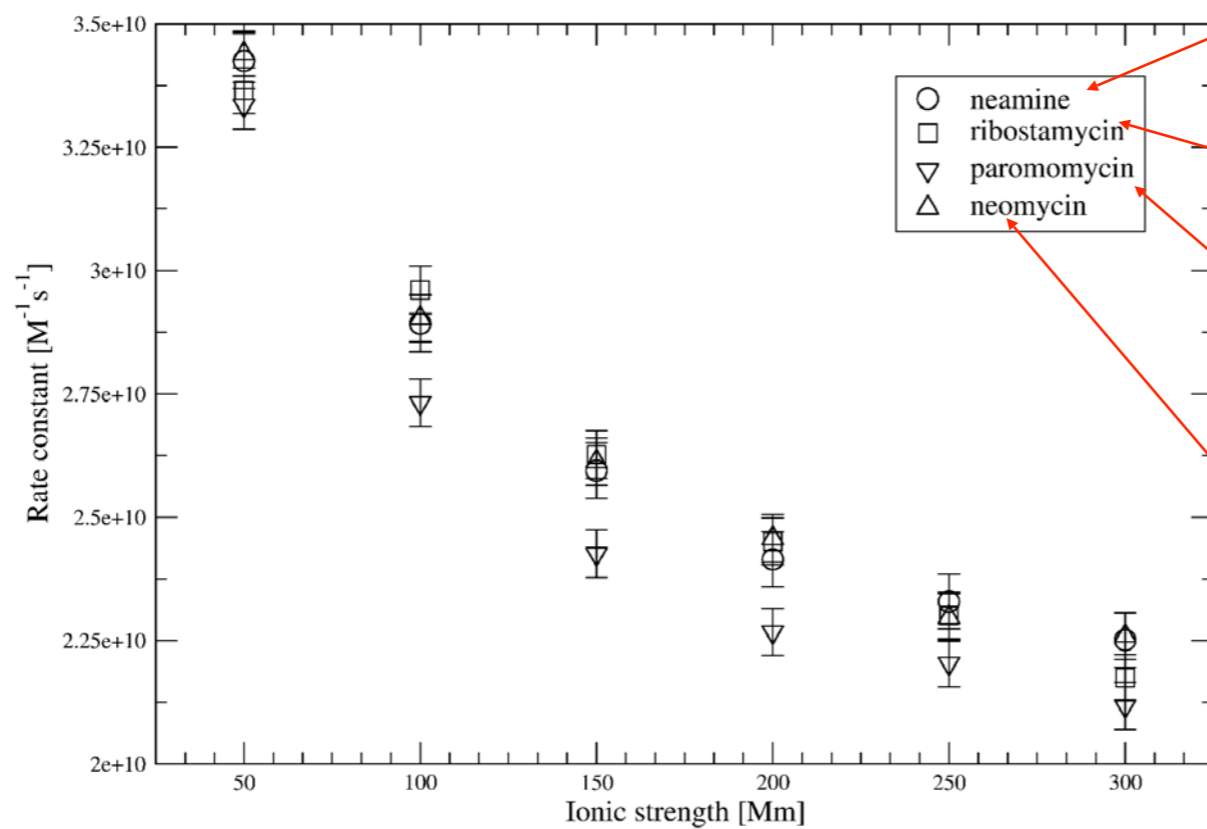
kryterium reakcji



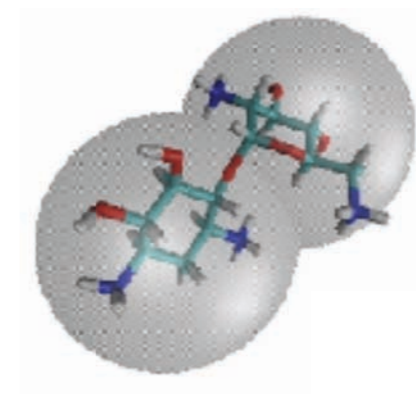
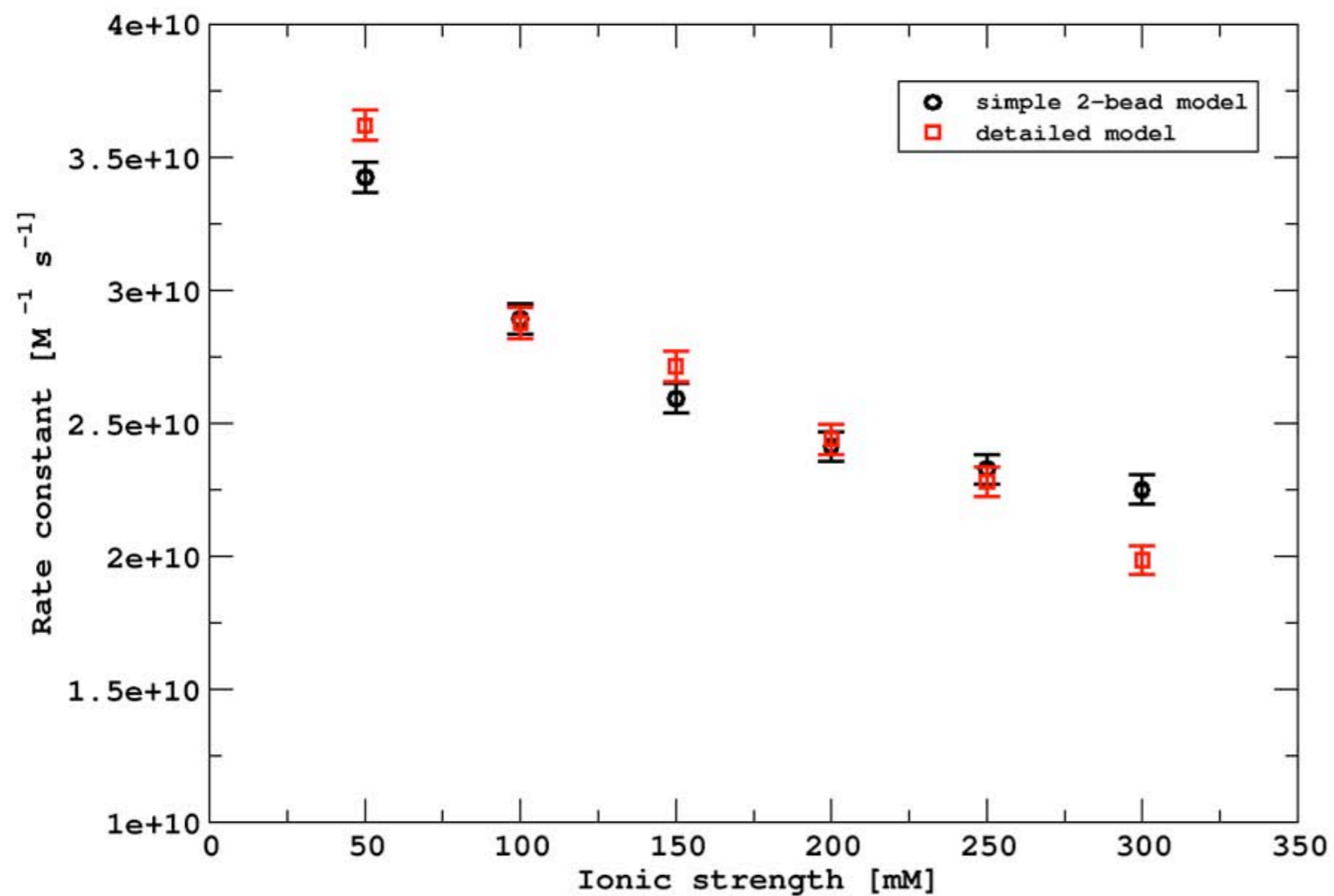
- częstość utworzenia kompleksu spotkaniowego -> stałe szybkości asocjacji
- najbardziej prawdopodobny mechanizm asocjacji
- zależność od siły jonowej



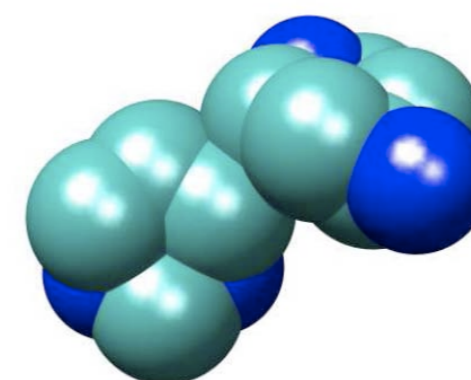
Stałe szybkości asocjacji



Dwa modele neaminy



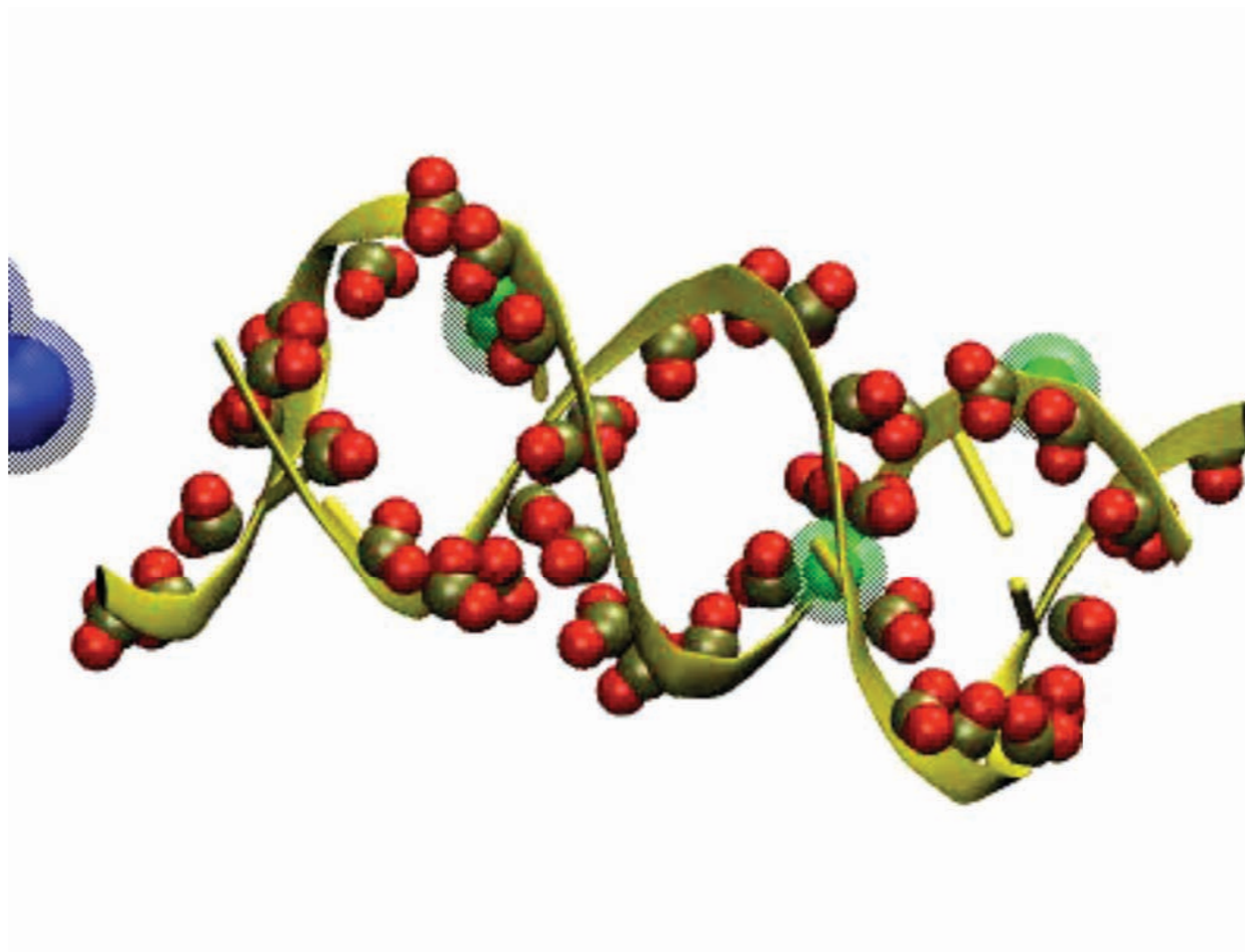
2 bead



13 beads



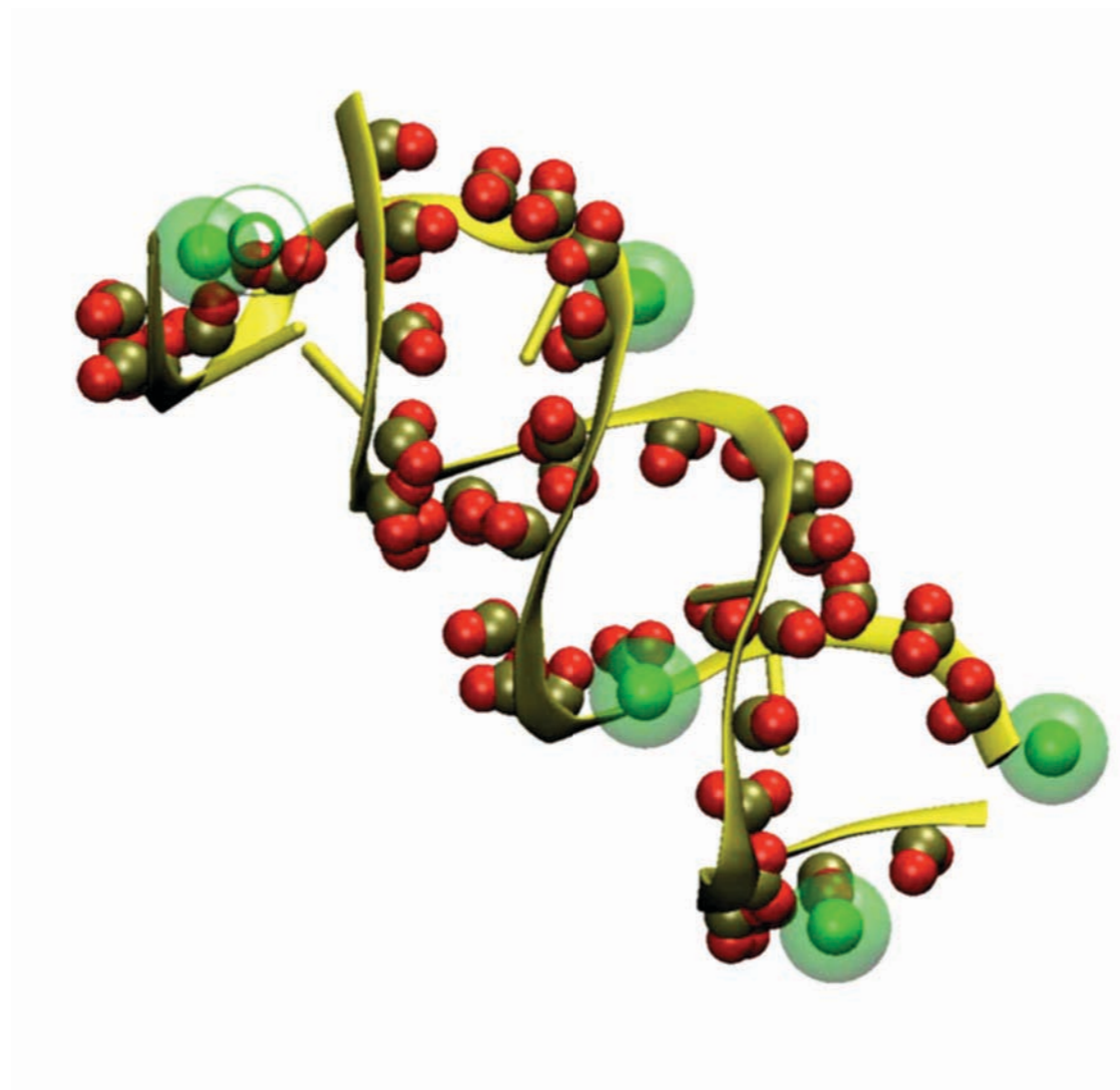
Mg²⁺ konkurują z paromomycyną



M. Dlugosz, J. M. Antosiewicz, J. Trylska, JCTC, 2008



Mg²⁺ konkurują z paromomycyną



Dynamika brownowska miejsca A

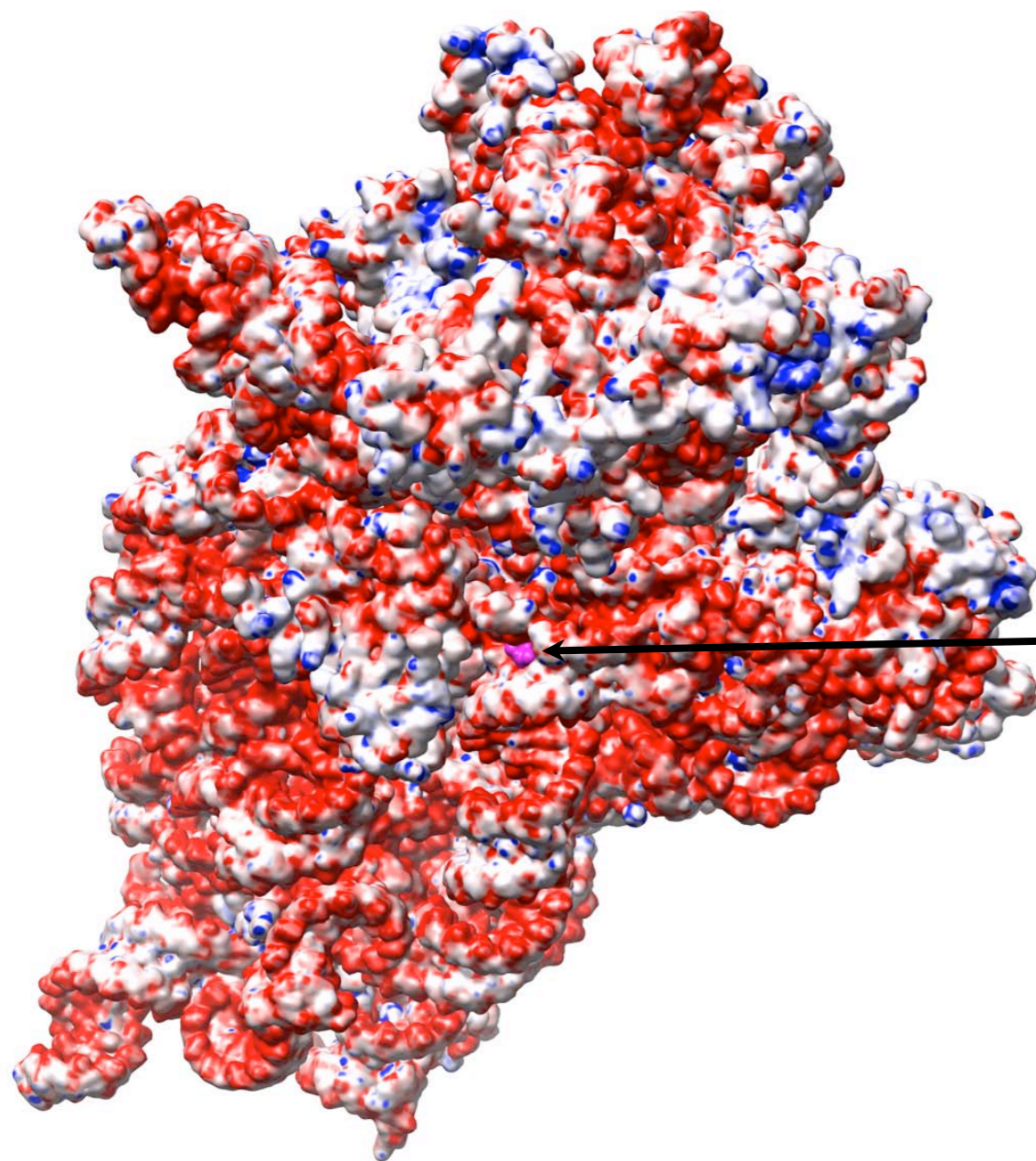
- antybiotyk ślizga się po helisie RNA przed związaniem
- podczas wiązania antybiotyk wypiera jeden lub dwa jony Mg^{2+}
- brak kooperatywności wiązania
- stałe szybkości asocjacji słabo zależą od siły jonowej



Potencjał elektrostatyczny na powierzchni 30S

SASA podjednostki 30S - $2.5 \times 10^5 \text{Å}^2$

SASA paromomycyny - $8.1 \times 10^2 \text{Å}^2$



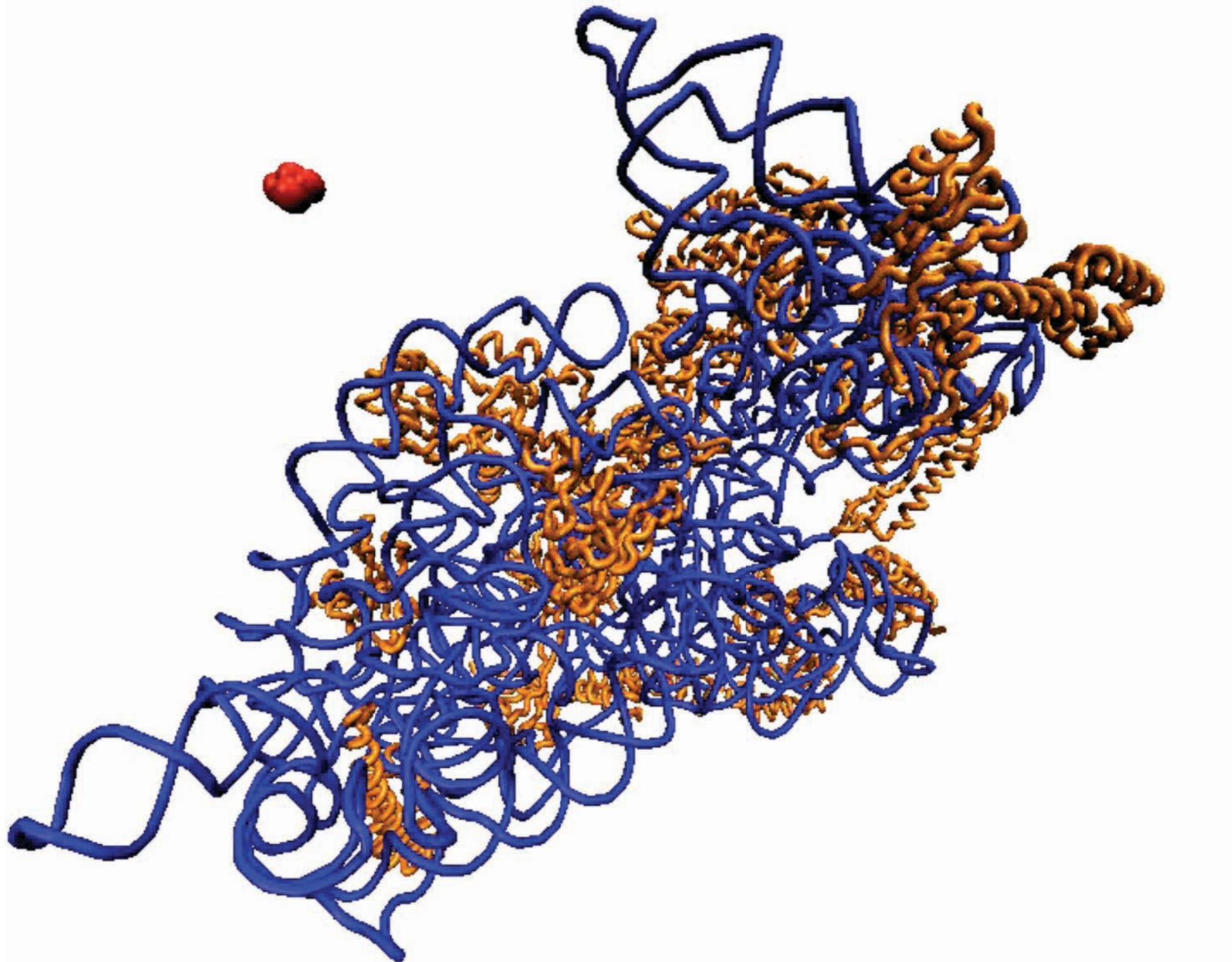
paromomycyna

-5kcal/mol

+5kcal/mol



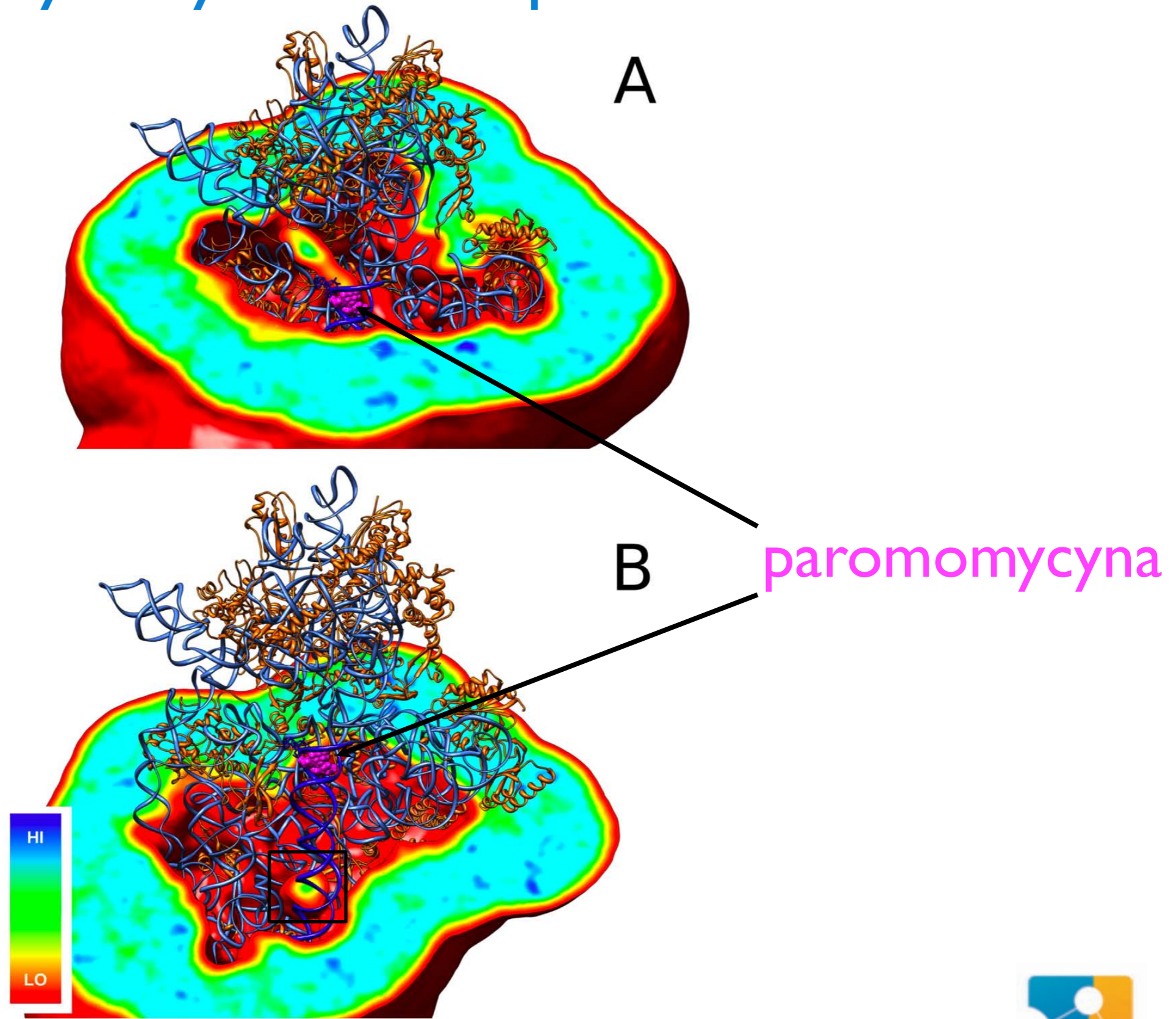
Podjednostka 30S



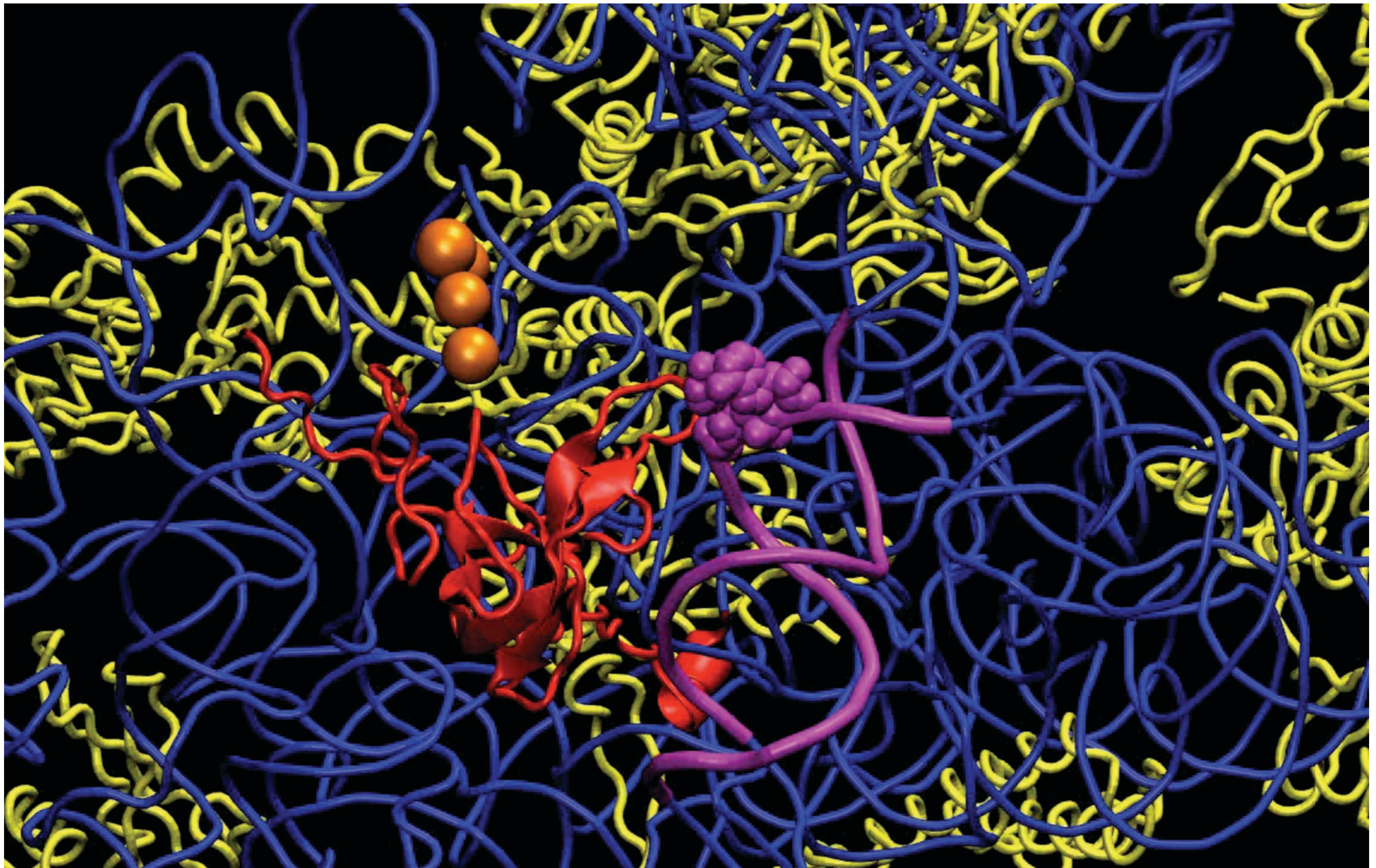
RNA białka 30S antybiotyki



Gęstość antybiotyku wokół powierzchni 30S



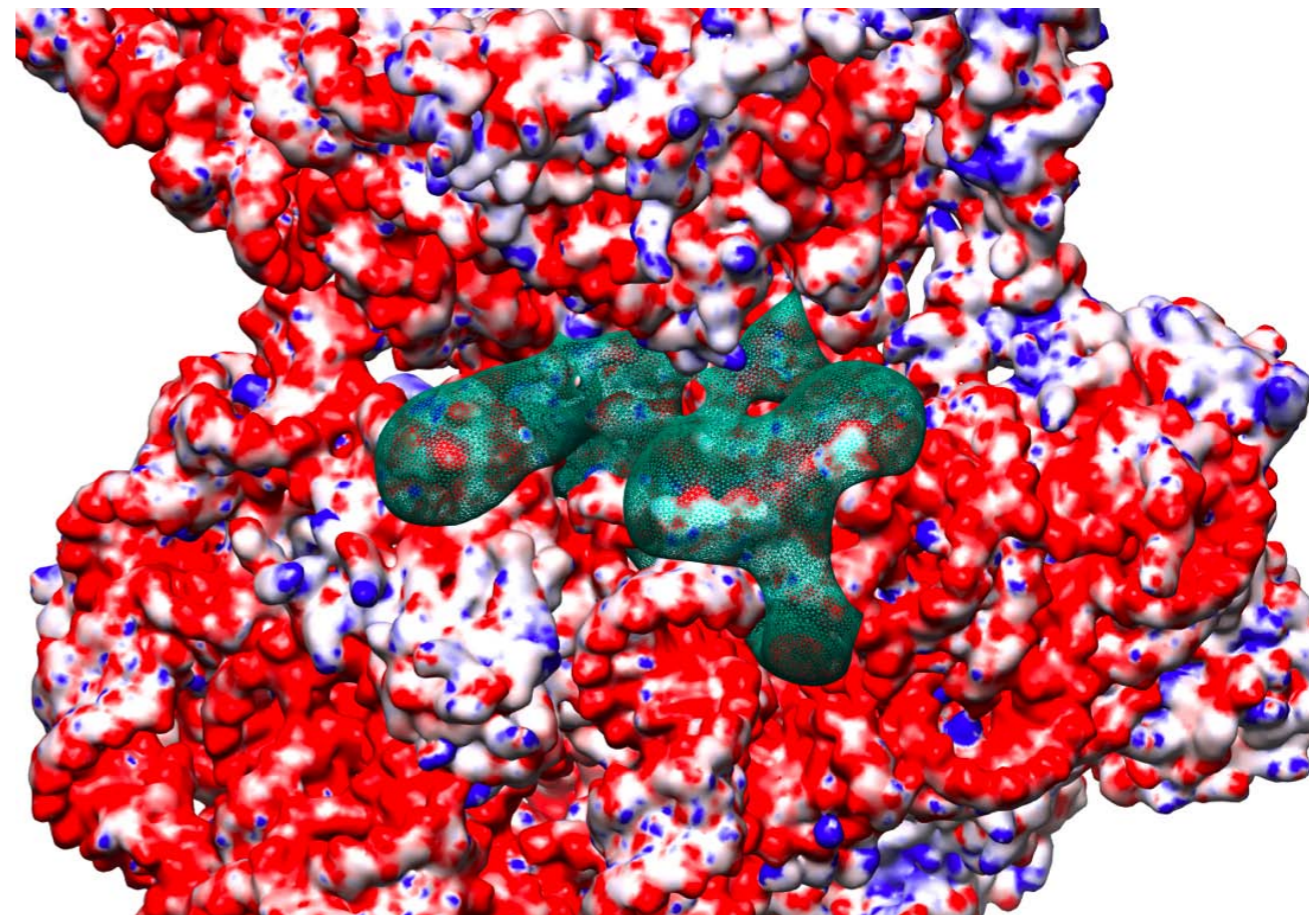
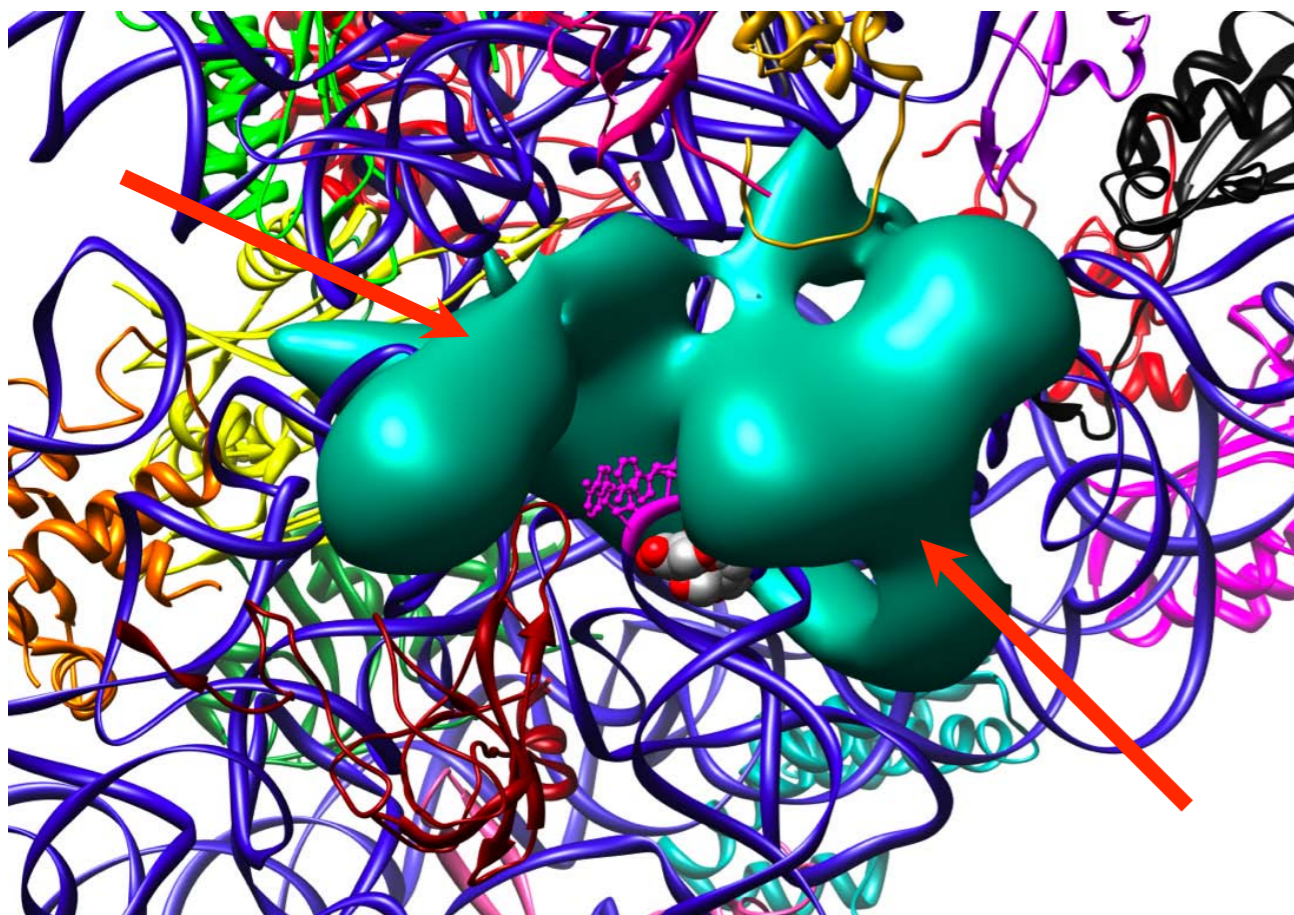
Asocjacja paromomycyny



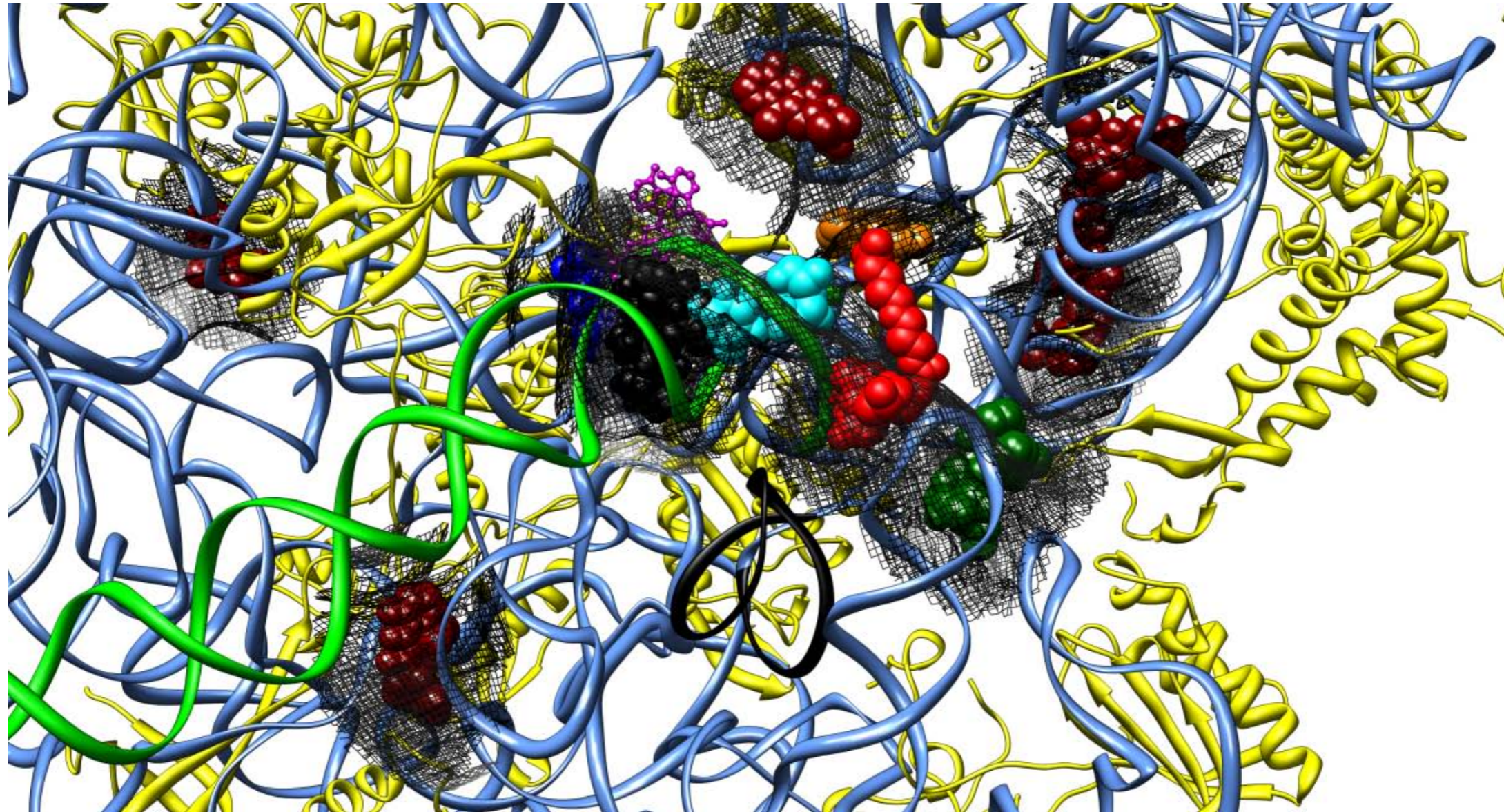
M. Dlugosz, J. Trylska, submitted



Lokalna gęstość antybiotyku



Gęstość paromomycyny a miejsca wiązania innych antybiotyków



paromomycin pactamycin edeine tetracycline
streptomycin spectinomycin hygromycin B

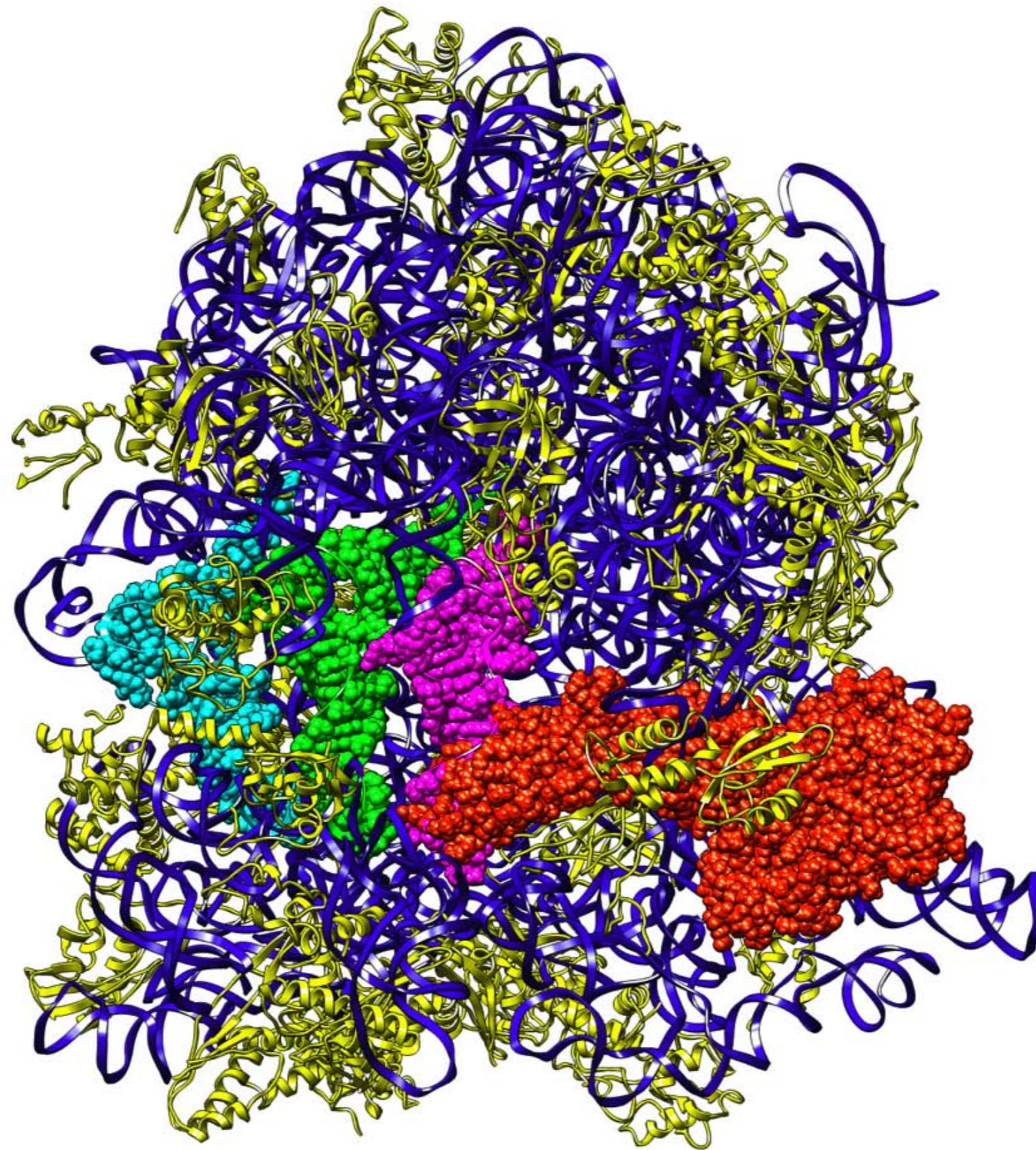
M. Długosz, J. Trylska, submitted



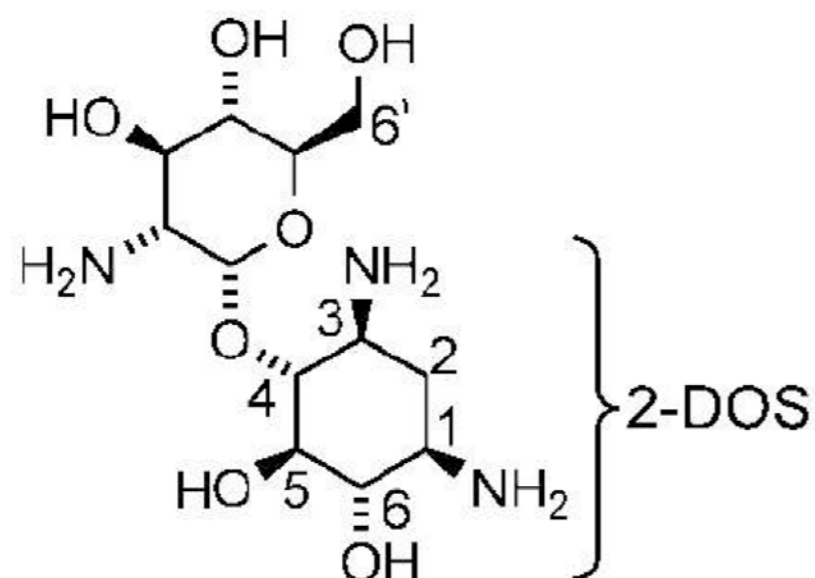
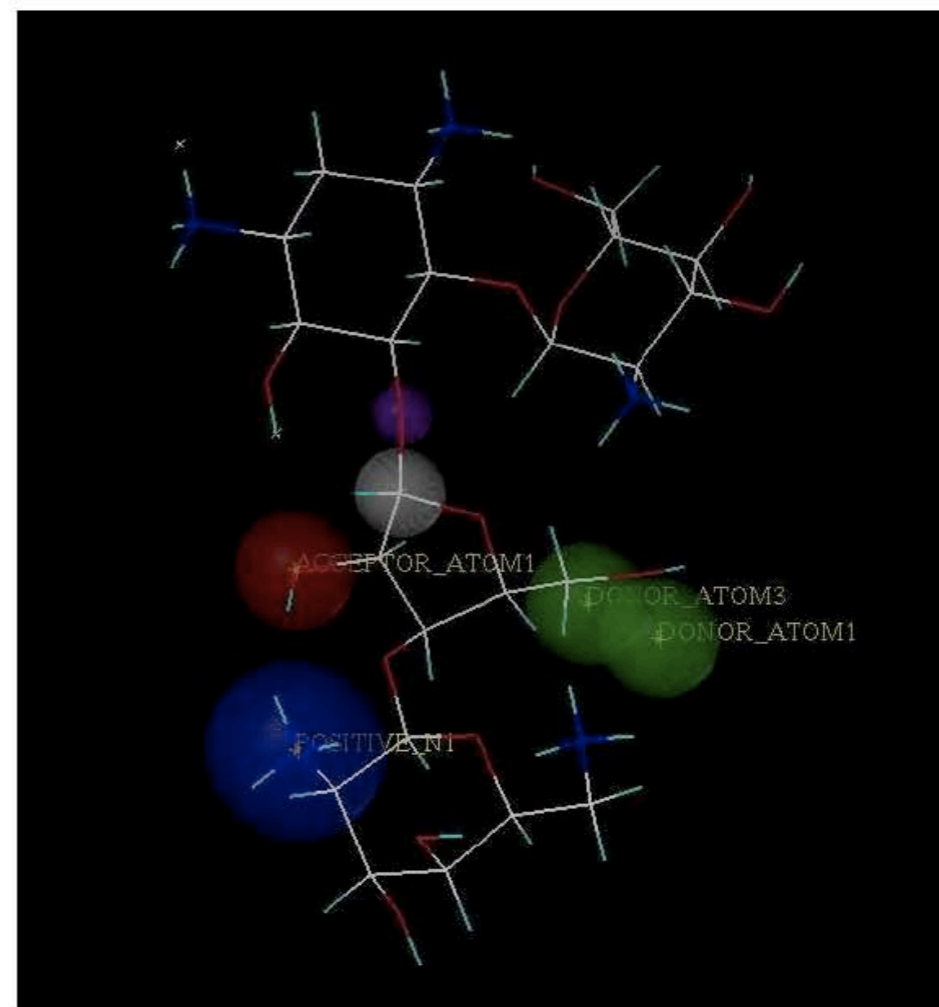
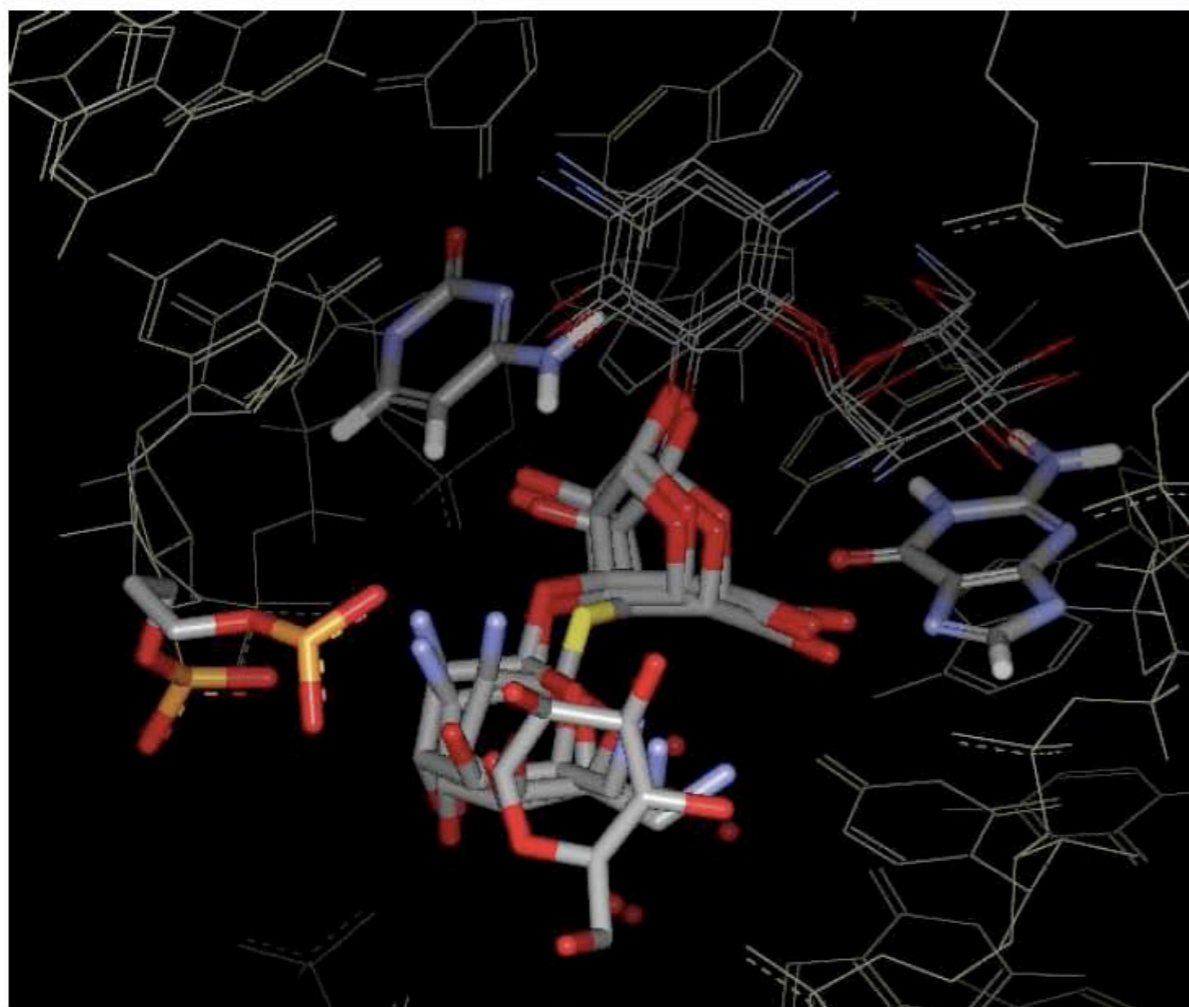
Dynamika brownowska dla podjednostki 30S

- antybiotyk penetruje powierzchnię podjednostki 30S
- antybiotyk może wejść do miejsca A z dwóch stron
- alternatywne miejsce wiązania
- stałe szybkości nie zależą od siły jonowej





W poszukiwaniu pochodnych aminoglikozydów

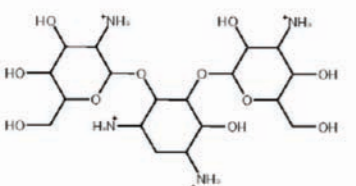
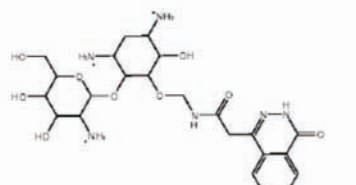
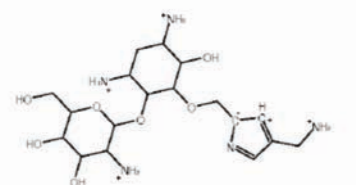
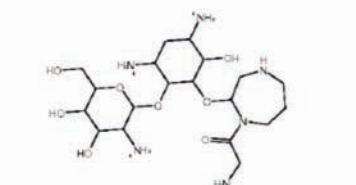
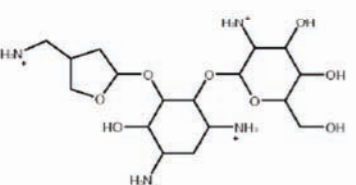
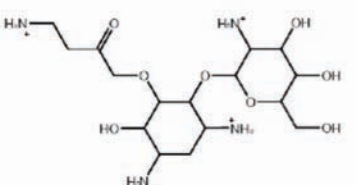


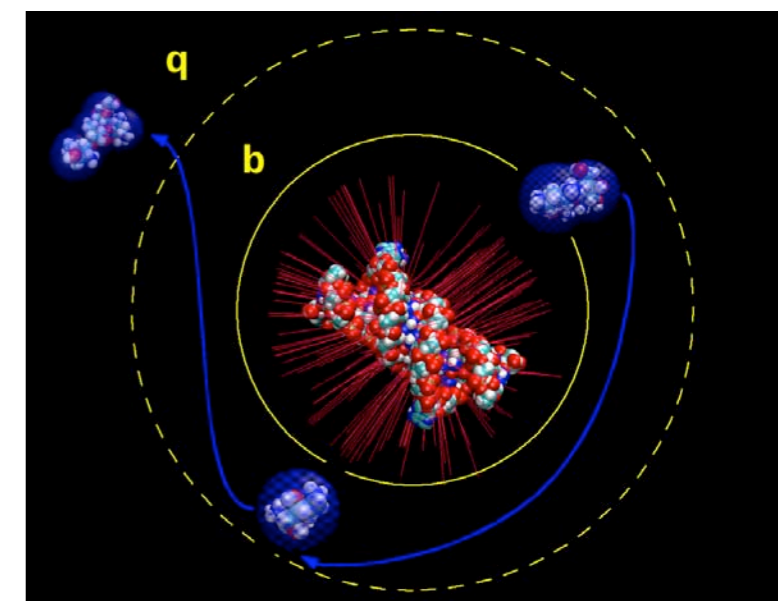
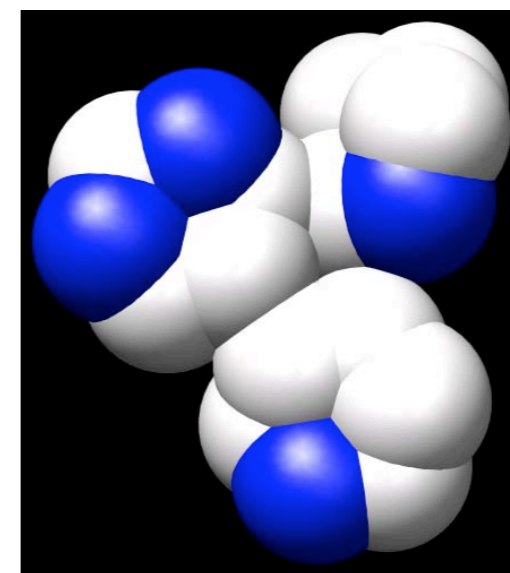
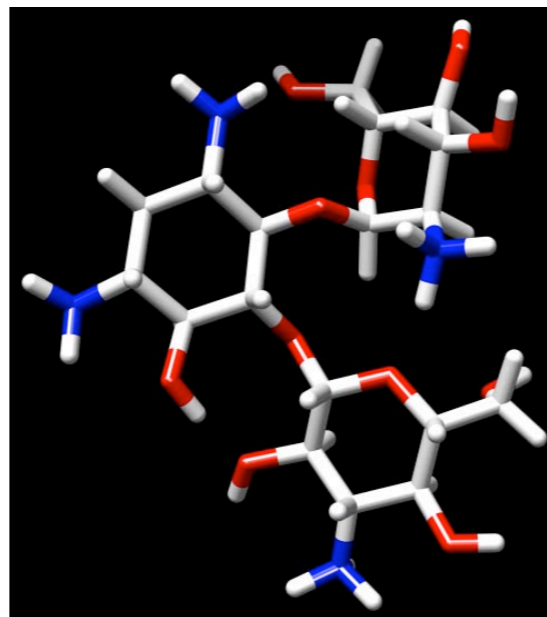
budowa farmakoforu

- struktury z PDB i MD
- rozkład wody i jonów



Wybrane związki

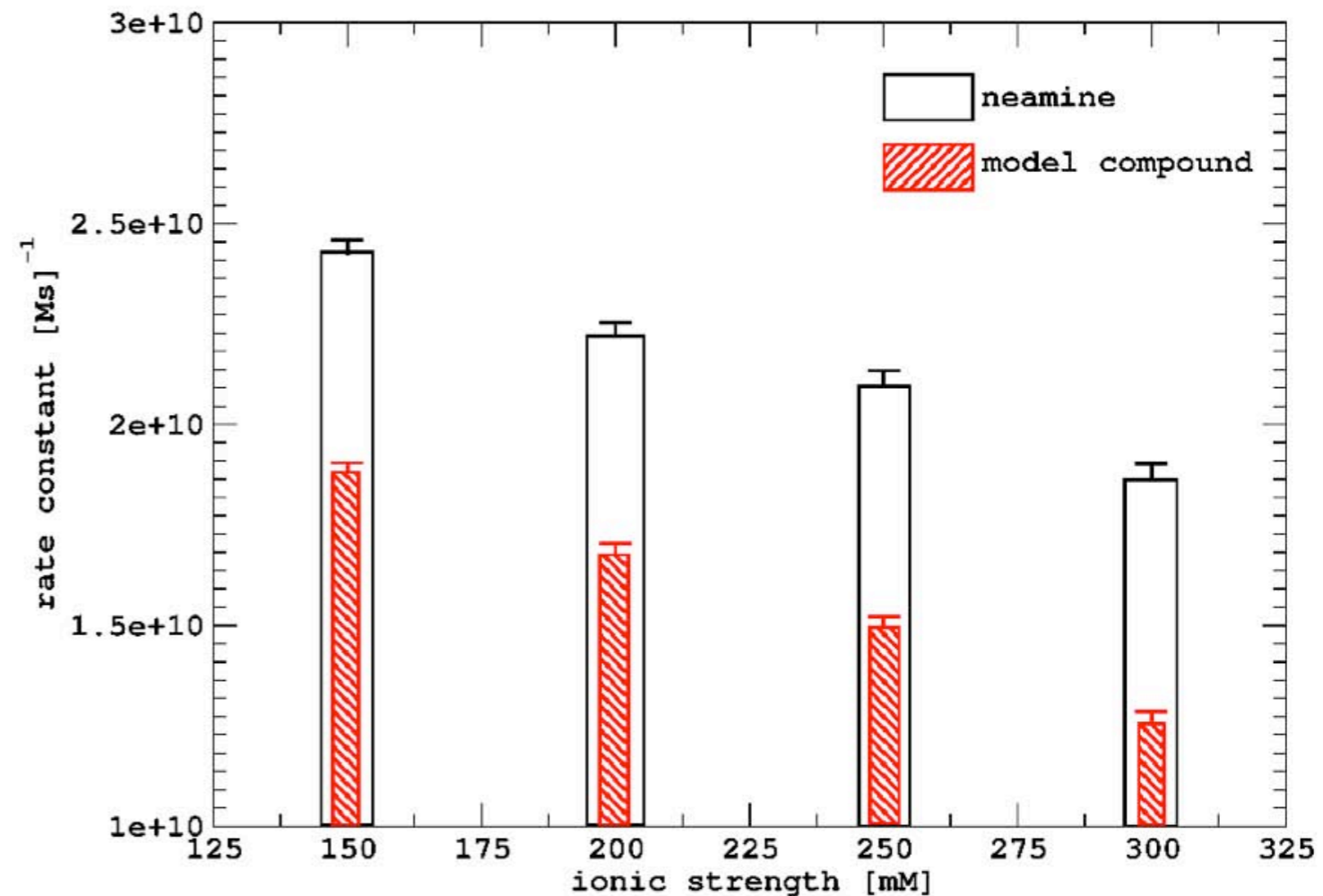
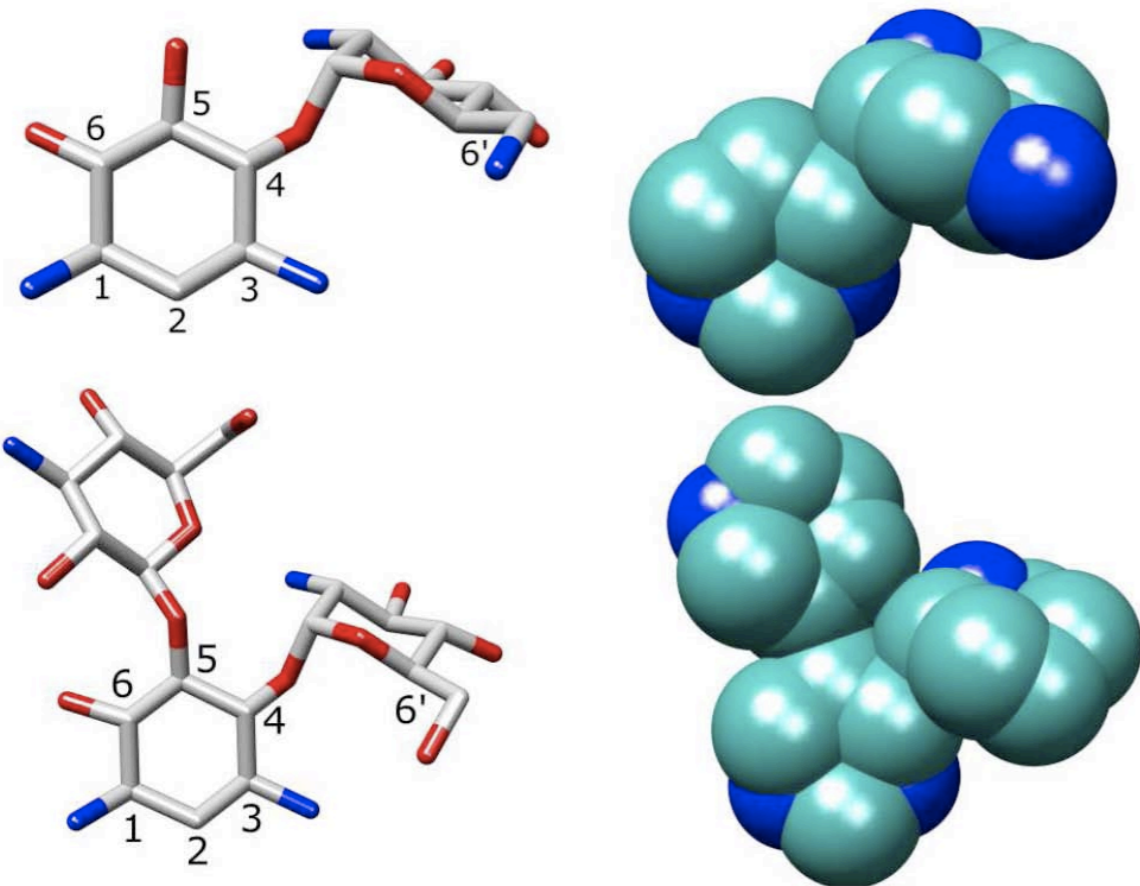
	mol	act pred
1		-30.3700
2		-27.6800
3		-30.9300
4		-30.1500
5		-30.0600
6		-30.5000



P. Setny, J. Trylska, submitted



Dynamika brownowska pochodnej neaminy



- dokładniejsze modele antybiotyków
- mechanizm asocjacji pochodnych aminoglikozydów



Podziękowania

Maciej Długosz
Julia Romanowska
Adam Górecki
Marcin Szypowski
Kasia Kulczycka
Paweł Kalbarczyk



Współpracownicy:
Piotr Setny
Magda Gruzziel
Paweł Grochowski
Jan Antosiewicz

Finansowanie:

- ICM Uniwersytet Warszawski
- Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (3T11F 005 30)
- FIRCA National Institutes of Health (R03 TW07318)
- Fundacja na rzecz Nauki Polskiej

