

Приложение к статье 3.3. Хайруллиной и др. «Конъюгаты десмикозина с фрагментами антимикробного пептида онкоцина: синтез, антибактериальная активность, взаимодействие с рибосомой»

1. Принятые сокращения

Вос — *трет*–бутилоксикарбонил, DES — десмикозин, DIPEA — диизопропилэтиламин, DMF — *N,N*–диметилформамид, Fmoc — флуоренилметилоксикарбонил, GABA — 4–аминобутановая кислота, HBTU — *O*–(бензотриазол–1–ил)–*N,N,N',N'*–тетраметилуроний гексафторфосфат, HFIP — 1,1,1,3,3,3–гексафторизопропанол, LC–MS — хромато–масс–спектрометрия, ONC — онкоцин 112, Pip — пиперидин, tBu — *трет*–бутил, ТСХ — тонкослойная хроматография.

2. Методики синтеза пептидов 1а–3а

Синтез пептидов *Fmoc*–Lys(Boc)ProProTyr(tBu)–OH (**1а**), *Fmoc*–Asp(tBu)Lys(Boc)ProProTyr(tBu)–OH (**2а**), Boc–ValAsp(tBu)Lys(Boc)ProProTyr(tBu)–OH (**3а**) был осуществлен согласно стандартному Fmoc–протоколу с использованием 2–хлортритильного полимера (1,6 ммоль Cl–/г) (рис. S1) [1]. В качестве активирующего агента использовали HBTU. Подготовка 2–хлортритильной смолы к синтезу осуществлялась следующим образом. В сосуде Меррифильда замачивали 2 г смолы в DMF на 10–15 мин. Растворитель удаляли фильтрованием и смолу последовательно промывали: диоксаном (1×4 мин), DMF (1×4 мин), CH₂Cl₂ (1×4 мин) из расчета 10 мл растворителя на 1 г смолы. Далее осуществляли посадку первой аминокислоты: *Fmoc*–Тир(tBu)–OH (2 экв. относительно загрузки смолы) и DIPEA (2 экв.) растворяли в CH₂Cl₂ и добавляли в сосуд со смолой, перемешивали 10 мин. После добавляли еще 3 экв. DIPEA и перемешивали час. Затем добавляли 2 мл метанола и перемешивали еще 10 мин. Растворитель отделяли фильтрованием, смолу промывали последовательно CH₂Cl₂ (3×20 мл), DMF (3×20 мл), метанолом (3×20 мл). Смолу высушивали в вакуумном экскаторе и определяли посадку. Удлинение пептидной цепи осуществляли согласно следующему протоколу:

1. Промывка смолы DMF (3×20 мл).
2. Снятие Fmoc–защиты 20%–ным раствором пиперидина в DMF (1×5 мин, 1×15 мин).

3. Контроль посадки с помощью Fmoc–теста [2].
4. Промывка DMF (2×20 мл).
5. Преактивация: Fmoc–аминокислоту (3 экв.), НВТУ (3 экв.), DIPEA (3 экв.) растворяли в DMF (1×5 мин).
6. Добавление смеси из пункта 5 к полимеру. Конденсация (30–60 мин). Добавляли 0,6 экв. DIPEA через 10–20 мин после начала конденсации.
7. Фильтрование. Промывка с чередованием DMF (3×20 мл) и изопропанол (3×20 мл).
8. Контроль конденсации с помощью теста Кайзера [3, 4] — в случае отрицательного результата переходили к следующему пункту, в случае положительного — повторяли стадии 5–7.
9. Кэпирование свежеприготовленным раствором уксусный ангидрид–DIPEA–DMF (5 : 6 : 89, v/v) (1×5 мин, 1×30 мин).
10. На последней стадии смолу последовательно промывали DMF (1×5 мин), CH_2Cl_2 (1×5 мин) и отбирали часть пептидил–полимера с требуемой длиной пептида. Оставшуюся смолу использовали для дальнейшего синтеза. Пептид отщепляли от смолы с помощью 50%–ного раствора HFIP в CH_2Cl_2 , далее растворитель удаляли на роторном испарителе.

Fmoc–Lys(Boc)ProProTyr(tBu)–OH (1a). Очистку продукта проводили с использованием колоночной хроматографии в системе $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9/1$. Выход: 165 мг (55%, 0,187 ммоль); TCX: R_f 0,54 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9/1$); MALDI-TOF MS, m/z вычислено для $[\text{C}_{49}\text{H}_{63}\text{N}_5\text{O}_{10} + \text{Na}]^+ = 904,4$; найдено — 904,5; Аминокислотный анализ: Lys 1,00 (1), Pro 1,60 (2), Tyr 1,05 (1).

Fmoc–Asp(tBu)Lys(Boc)ProProTyr(tBu)–OH (2a). Очистку продукта проводили с использованием колоночной хроматографии в системе $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 6/1$. Выход: 73 мг (67%, 0,069 ммоль); TCX: R_f 0,47 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 6/1$); LC–MS, m/z вычислено для $[\text{C}_{57}\text{H}_{76}\text{N}_6\text{O}_{13} + \text{Na}]^+ = 1075,5$; найдено — 1075,5, $\tau = 1,89$ мин; Аминокислотный анализ: Asp 0,86 (1), Lys 0,92 (1), Pro 2,25 (2), Tyr 1,00 (1).

Boc–ValAsp(tBu)Lys(Boc)ProProTyr(tBu)–OH (3a). Очистку продукта проводили с использованием колоночной хроматографии в системе $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 6/1$. Выход: 101 мг (40%, 0,098 ммоль); TCX: R_f 0,36 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 6/1$); LC–MS, m/z вычислено для $[\text{C}_{52}\text{H}_{83}\text{N}_7\text{O}_{14} + \text{H}]^+ = 1030,6$; найдено 1030,2; вычислено для $[\text{C}_{52}\text{H}_{83}\text{N}_7\text{O}_{14} + \text{Na}]^+ = 1052,6$; найдено — 1052,5, $\tau = 3,09$ мин; Аминокислотный анализ: Val 0,98 (1), Asp 1,02 (1), Lys 1,00 (1), Pro 2,13 (2), Тир 0,93 (1).

3. Дополнительные рисунки S1–S3 и дополнительная таблица S1

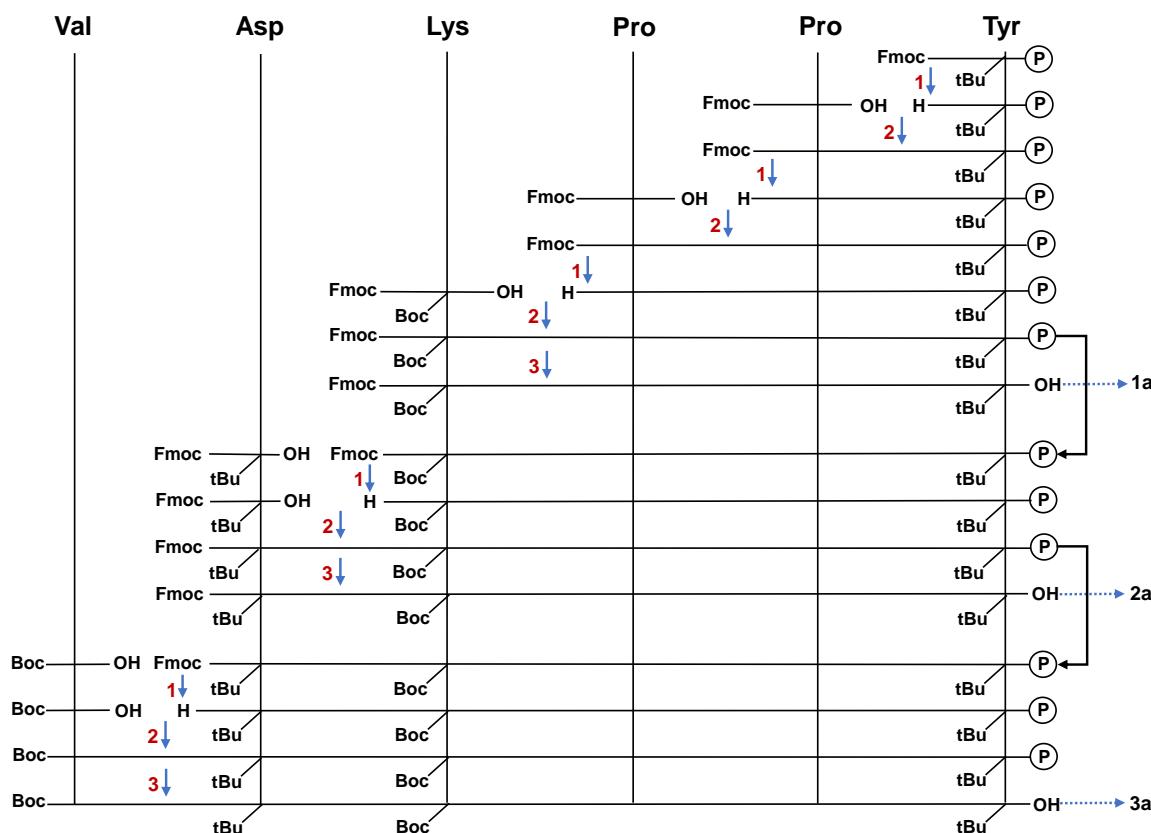


Рисунок S1. Схема синтеза защищенных пептидов **1a**, **2a**, **3a**. 1 – Pip/DMF, 2 – HBTU/DIPEA/DMF, 3 – HFIP/CH₂Cl₂.

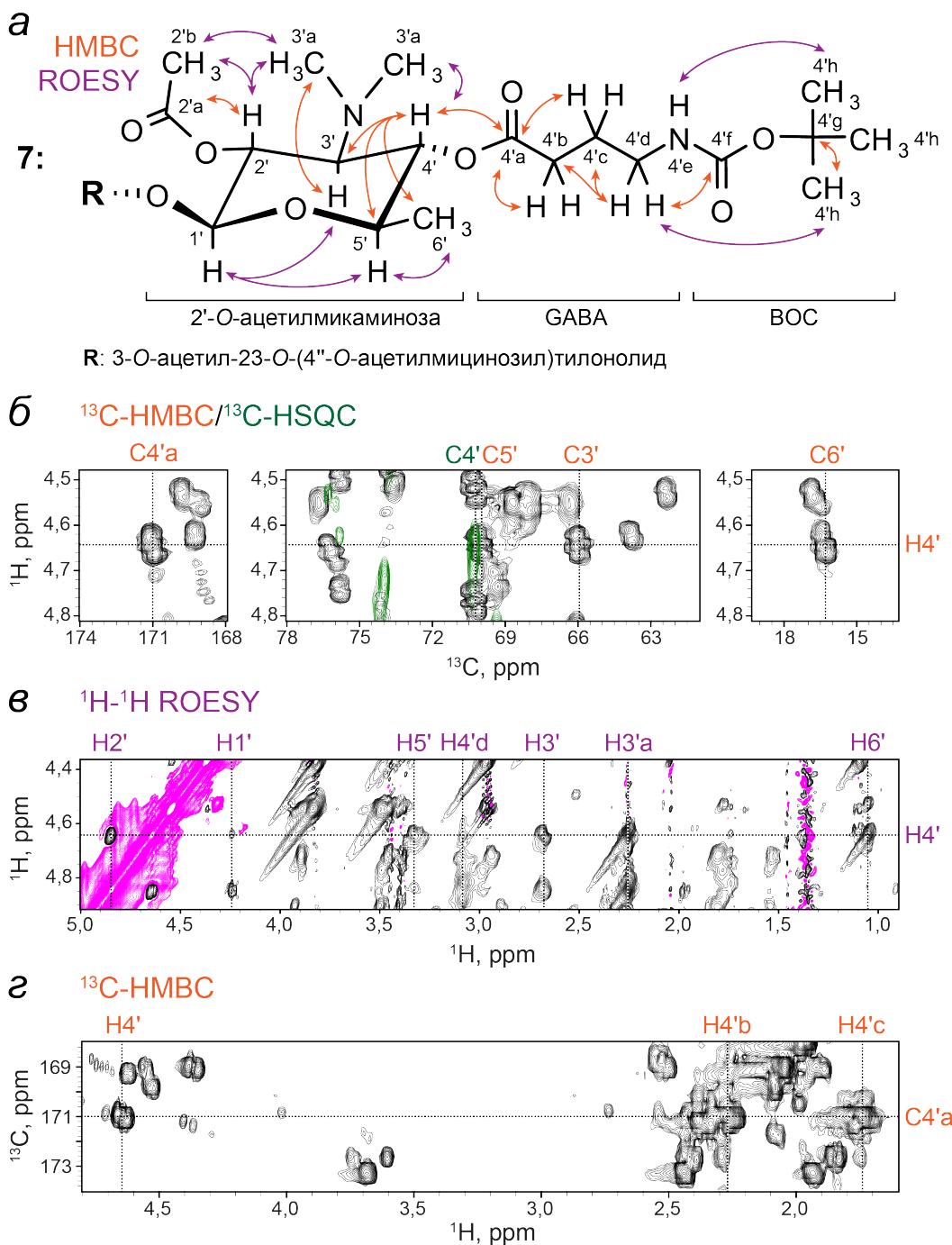


Рисунок S2. Доказательство структуры соединения 7 методами двумерной ЯМР спектроскопии. **а** – Основные корреляции в спектрах ^{13}C -HMBC (оранжевые стрелки) и ROESY (фиолетовые стрелки), доказывающие наличие BOC-GABA-группы на $4'$ -О-атоме микаминозы в соединении 7. **б** – Фрагменты наложенных спектров ^{13}C -HMBC (черный) и ^{13}C -HSQC (зеленый), отображающие корреляции между атомом $\text{H}4'$ и атомами углерода, в том числе атомом $\text{C}4'$ карбонильной группы BOC-GABA. **в** – Фрагмент спектра ROESY, содержащий кросс-пики между атомом $\text{H}4'$ и другими атомами водорода, позволяющий идентифицировать его химический сдвиг. **г** – Фрагмент спектра ^{13}C -HMBC, содержащий кросс-пики между атомом $\text{C}4'$ и атомами водорода, позволяющий идентифицировать его химический сдвиг.

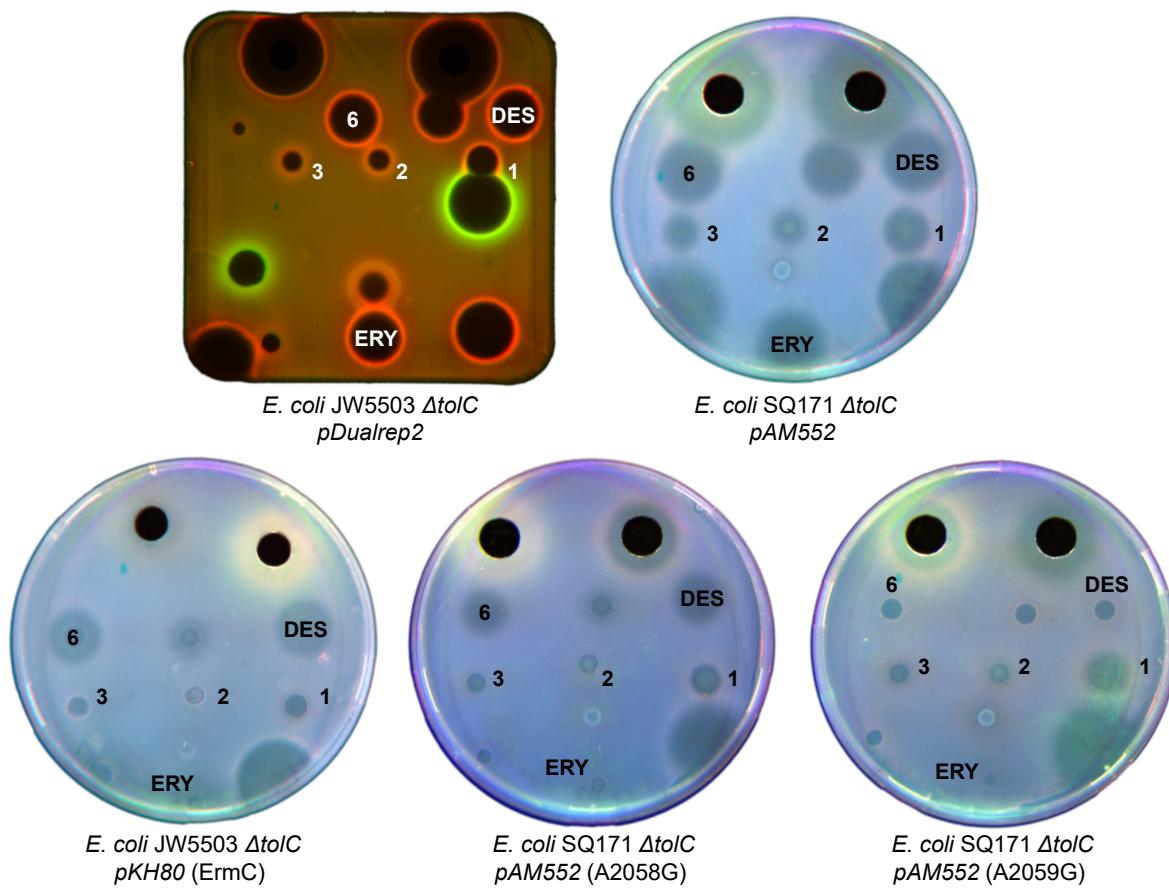


Рисунок S3. Тестирование конъюгатов десмикозина с фрагментами онкоцина на антибиотическую активность по отношению к различным штаммам бактерий *E. coli*. Представлены полные изображения чашек.

Таблица S1. Значения МИК, полученные для штамма *E. coli* SQ171 $\Delta tolC$, а также штаммов *E. coli* SQ171 $\Delta tolC$ A2058G и *E. coli* SQ171 $\Delta tolC$ A2059G, содержащих соответствующие мутации в 23S pPHK.

Штамм	МИК (мкМ)		
	ERY	DES	6
SQ171	2	3	13
SQ171 A2058G	>1360	47	>200
SQ171 A2059G	>1360	188	>200

4. Методы молекулярно–динамического моделирования

Общие условия моделирования

Все расчеты молекулярной динамики и анализ полученных траекторий проводились с использованием пакета GROMACS [5, 6] версии 5.1.4. Канонические и модифицированные аминокислотные и нуклеотидные остатки моделировались с использованием силового поля Amber14sb [7], а десмикозин и его производные — с помощью силового поля GAFF [8]. При этом оптимизированные трехмерные структуры и молекулярные электростатические потенциалы вновь параметризуются остатков и соединений получались квантово–химическими расчетами методом Хартри–Фока с базисом 6–31G*. Точечные заряды вычислялись в модели RESP [9].

Временной шаг интегрирования во всех вычислениях составлял 2 фс, координаты записывались в файл траектории каждые 25 пс. Для ограничения длин связей с атомами водорода использовался алгоритм LINCS [10]. Моделирование выполнялось при температуре 310 К с периодом привязки 0,1 пс под управлением термостата масштабирования скоростей с добавочным стохастическим членом [11] и периодических граничных условиях с изотропным постоянным давлением, поддерживаемым баростатом Берендсена [12] с периодом привязки 5 пс. Электростатические взаимодействия обрабатывались посредством сети частиц Эвальда [13] с шагом сетки 0,125 нм и четвертым порядком интерполяции. Моделируемые системы центрировались в тетрагональной ячейке размером $9,5 \times 9,5 \times 9,4$ нм, заполненной молекулами воды TIP4P_{EW} [14] так что грани системы были покрыты слоем растворителя в 0,9 нм. Остаточный отрицательный заряд системы был компенсирован ионами калия с оптимизированными параметрами [15], причем добавляемые ионы располагались вблизи отрицательно заряженных групп [16] (программный код был любезно предоставлен А.О. Залевским). Кроме того, часть молекул воды была случайным образом заменена ионами калия, магния и хлорид–анионами с тем, чтобы препятствовать вымыванию противоионов магния и калия в водную фазу; при этом в водной фазе устанавливались концентрации MgCl₂ в 7 мМ и KCl в 100 мМ. Остатки, хотя бы один атом которых находится в пределах 0,1 нм от грани моделируемого участка рибосомы, были позиционно ограничены, при том, что все остальные могли свободно двигаться. Подобный подход уже применялся для моделирования рибосомного туннеля и не оказывает влияния на подвижность остатков рРНК, составляющих стенки рибосомного туннеля.

Количество и протяженность траекторий приведены в таблице S2. Протокол равновесной динамики включал в себя следующие стадии:

1. минимизация потенциальной энергии системы методами наискорейшего спуска и сопряжённых градиентов;
2. расчёт 20 пс равновесной молекулярной динамики при постоянных объеме и температуре, ограниченной подвижности всех компонентов системы, кроме воды и ионов;
3. расчёт 100 пс равновесной молекулярной динамики при постоянных давлении и температуре, ограниченной подвижности всех компонентов системы, кроме воды и ионов;
4. минимизация потенциальной энергии системы методом сопряжённых градиентов;
5. 20 шагов итеративной оптимизации полученного состояния: состояние системы, возникающее на очередном шаге, является исходным для последующего: расчёт 50 пс молекулярной динамики при постоянных давлении и температуре 20 К исходя из полученного состояния с последующей минимизацией потенциальной энергии системы методом сопряжённых градиентов;
6. расчёт 3 нс равновесной молекулярной динамики при постоянном давлении и температуре, растущей с 20 К до 310 К за первые 2 нс и далее не меняющейся. Шаг интегрирования составлял 1 фс.
7. Расчёт равновесной молекулярной динамики при постоянных давлении и температуре нужной продолжительности.

Методы анализа траекторий

Анализ траекторий включал анализ водородных связей и стэкинг–взаимодействий, кластеризацию методом GROMOS [17] и расчёт энергий нековалентных взаимодействий, понимаемых как сумма энергий ван-дер-Ваальсовых E_{VdW} и электростатических $E_{Coulomb}$ взаимодействий:

$$E = E_{VdW} + E_{Coulomb} \quad (1)$$

Анализ местонахождения и частоты встречаемости водородных связей основывался на геометрических критериях: водородная связь считалась существующей, если атом–донор водорода и атом–акцептор разделены расстоянием, меньшим 3,5 Å, и угол между соединяющей эти атомы линией и связью между атомом–донором и ковалентно

связанным с ним водородом меньше 30 градусов. Частота встречаемости водородной связи рассчитывалась как отношение количества кадров траектории, в которых обнаружена данная связь, к общему количеству кадров в траектории.

Также в ходе анализа использовалась специально разработанная программа для определения наличия стэкинг–взаимодействий между основаниями в заданной области. Определение основывалось на чисто геометрических соображениях, опираясь на три величины, вычисляемых для каждой анализируемой пары остатков: угол между плоскостями азотистых оснований, длина отрезка, отсекаемого плоскостью второго основания на нормали, исходящей из центра первого основания, — оценка межплоскостного расстояния и расстояние между точкой, в которой указанная нормаль пересекается плоскостью второго основания, и центром второго основания — межцентровое расстояние. При этом различались три случая:

- если межплоскостной угол был менее 30 градусов, межплоскостное расстояние между 1,8 Å и 5,2 Å и межцентровое расстояние менее 4 Å, то считалось, что основания вступили в стэкинг–взаимодействие;
- если межплоскостной угол менее 30 градусов, межплоскостное расстояние менее 1,8 Å и межцентровое расстояние между 5,5 Å и 8 Å, то считалось, что основания лежат в одной плоскости (и могут быть спарены, что необходимо проверять анализом водородных связей);
- в иных случаях считалось, что взаимодействия нет.

Вероятность образования стэкинг–взаимодействия оценивалась как количество кадров траектории, в которых было обнаружено это стэкинг–взаимодействие, отнесенное к общему количеству кадров в траектории.

Моделируемая система

Общие принципы

Структура рибосомы *E. coli* была извлечена из полученной методом рентгеноструктурного анализа структуры с разрешением 3,1 Å (код PDB: 4V7U) [18] с добавлением в 23S рРНК модифицированных оснований в соответствии со сведениями из банка данных [19]. Положения модифицированных оснований были оптимизированы минимизацией энергии сочетанием метода наискорейшего спуска с алгоритмом Бройдена–Флетчера–Гольдфарба–Шанно с ограниченным использованием памяти [20], за которой

следовал расчет короткой молекулярной динамики. При этом все немодифицированные основания были полностью зафиксированы, тогда как модифицированные основания, ионы и вода двигались, а эритромицин, содержащийся в исходной рентгеновской структуре, был изъят. После оптимизации были выделены все остатки, у которых хотя бы один атом попадал в кубическую область с ребром длиной 7 нм, включающую в себя весь рибосомный туннель и ПТЦ так, что центр этой области находился в туннеле, а сам туннель пролегал вдоль мысленной оси аппликат. Подобный подход использовался в работах [21, 22].

Десмикозин (DES)

В полученное выделение устанавливали тилозин, накладывая на этот фрагмент рибосомы структуру рибосомы *H. marismortui*, имеющую разрешение 3,0 Å (код PDB: 1K9M) [23]. Затем остаток микарозы удаляли, а конформацию остатка мицинозы в сайте связывания оптимизировали докингом, применяя пакет rDock [24], сохраняя при этом положение, ориентацию и конформацию лактонного кольца и остатка микаминозы неизменными. При моделировании остаток микаминозы был протонирован по 3'-диметиламиновой группе, а этилальдегидная группа была ковалентно связана с экзоциклической аминогруппой основания A2062 с образованием карбиноламина. При изучении эффекта мутации A2059G в построенной таким образом структуре заменялось соответствующее азотистое основание.

Онкоцин 112 (ONC)

При моделировании комплекса ONC с рибосомой *E. coli* в то же выделение устанавливали ONC, накладывая на этот фрагмент рибосомы структуру комплекса онкоцина 112 с рибосомой *T. thermophilus*, имеющую разрешение 2,9 Å (код PDB: 4Z8C) [25]. При изучении эффекта мутации A2059G в построенной таким образом структуре заменялось соответствующее азотистое основание.

Конъюгаты десмикозина с N-концевыми фрагментами онкоцина 112

При моделировании онкоцин–десмикозиновых конъюгатов исходные состояния структуры их комплексов с рибосомой *E. coli* получали, накладывая на описанную выше структуру комплекса десмикозина пептиды $^1\text{V}\text{DKPPY}^6$ или $^3\text{KPPY}^6$, взятые из указанной выше структуры комплекса ONC. При этом остаток 4-аминомасляной

кислоты (GABA), соединяющий десмикозиновую и онкоциновую части конъюгата, был смоделирован с помощью программы PyMOL на основании остатков Leu⁷ и Pro⁸ ONC. В ходе молекулярно-динамического моделирования этилальдегидная группа была ковалентно связана с эндоциклической аминогруппой основания A2062 с образованием карбинальамина. При изучении эффекта мутации A2059G в построенной таким образом структуре заменилось соответствующее азотистое основание.

VDKPPY-DES и KPPY-DES сохраняют характерные для 16-членных макролидов водородные связи 2'-гидроксильной группой микаминозы с N¹ основания A-2058, O_{3''}-метоксигруппы и O_{4''}-гидроксильной группы мицинозы с N¹ и O⁶ основания G748 соответственно. При введении мутации A2059G, а также для тетрапептидного конъюгата, водородная связь O_{4''}-гидроксильной группы мицинозы с 2'-гидроксильной группой остатка A751 меняет свой характер: атом O_{4''}-гидроксильной группы мицинозы превращается из донора в акцептор. Водородные связи десмикозиновой части десмикозин-онкоциновых конъюгатов оказываются несколько менее стабильными, чем у десмикозина, что можно объяснить противоречием между связыванием онкоциновой и десмикозиновой частей. Остаток GABA, соединяющий их, оказывается недостаточно длинным, чтобы эти фрагменты могли в полной мере взаимодействовать со своими участками рибосомного туннеля, не перетягивая друг друга. В этом противостоянии побеждает десмикозиновая часть: можно заметить, что для обоих конъюгатов водородные связи онкоциновой части ослаблены и перераспределены сравнительно с самим онкоцином. Основную роль в связывании онкоциновой части играет остаток Туг⁶ благодаря гидрофобным контактам с основаниями A2451 и C2452 (канонический сайт связывания хлорамфеникола) и водородным связям с остатком G2061 (табл. S6). Для VDKPPY-DES эффект перетягивания GABA-линкера выражен сильнее, чем для KPPY-DES.

Тем не менее, благодаря онкоциновой части VDKPPY-DES и KPPY-DES сохраняют при введении мутации A2059G водородные связи десмикозиновой части лучше, чем десмикозин. Объясняется это тем, что онкоциновая часть удерживает GABA-линкером остаток микаминозы на месте, уменьшая общее смещение десмикозиновой части и стабилизируя её водородные связи. При этом стерическое противоречие в большей, чем для десмикозина, степени разрешается за счёт смещения основания G2059, а не десмикозиновой части, причём для KPPY-DES это явление более выражено, чем для VDKPPY-DES. По всей видимости, поэтому KPPY-DES сохраняет водородные связи микаминозы лучше.

VDKPPY-DES(Ac)₃ (3)

При моделировании соединения **3** ацетильные группы вводились на 2'-гидроксильную группу остатка микаминозы, 4"-гидроксильную группу остатка мицинозы и 3-гидроксильную группу лактонного кольца. Введенные в остатки сахаров ацетильные группы вступают в стерические противоречия с остатками 23S рРНК при конформации десмикозиновой части конъюгата, восходящей к рентгеноструктурным данным. Поэтому мы искали методами молекулярно-динамического моделирования такую конформацию триацетилированного конъюгата, которая обеспечивала бы его стабильное взаимодействие с сайтом связывания макролидов при условии возможности образования ковалентной связи с основанием A2062.

Мы исходили из той же конформации десмикозиновой части, что и для неацетилированных конъюгатов. В ней с помощью программы PyMOL были минимизированы стерические противоречия ацетильных групп с остатками сайта связывания. Построенная таким образом система была введена в описанный выше протокол моделирования равновесной молекулярной динамики до стадии нагрева системы включительно, причем в ходе моделирования полную подвижность сохраняли вода, ионы, десмикозиновая часть и остаток GABA конъюгата. Подвижность атомов фрагмента рибосомы была ограничена параболическим потенциалом с силовой константой 1000 кДж/нм², а подвижность атомов онкоциновой части была ограничена параболическим потенциалом с силовой константой 10 кДж/нм².

Полученная при этом конформация моделируемой системы использовалась для расчёта уравновешенной метадинамики [26] с обменом реплик [27] для введённых ацетильных групп. Расчёт выполнялся при помощи пакета PLUMED версии 2.3 [28], работающего в комплексе с пакетом GROMACS версии 5.1.4. Взвешивающий потенциал подстраивали, добавляя к нему одно- и двумерные гауссовые функции высотой 3 кДж/моль и шириной 10 градусов с периодичностью 2500 шагов (5 пс) до тех пор, пока высота гауссиан не достигла порядка 0,1 кДж/моль. Взвешивающий коэффициент составлял 8, использовалось 6 реплик. Обобщенными координатами были выбраны торсионные углы при связях, соединяющих остатки микаминозы и мицинозы с лактонным кольцом и ацетильные группы с остатками сахаров и лактонным кольцом (рис. S4). В ходе этих расчётов подвижность атомов сахарофосфатного остова 23S рРНК была ограничена параболическим потенциалом с силовой константой 1000 кДж/нм², а подвижность атомов онкоциновой части

была ограничена параболическим потенциалом с силовой константой 10 кДж/нм². Подвижность воды, ионов, десмикозиновой части конъюгата, аминокислотных остатков и азотистых оснований не ограничивалась.

Чтобы выявить те конформации, в которых система задерживалась в ходе метадинамики и которые, таким образом, близки к минимумам свободной энергии, мы кластеризовали методом GROMOS [17] с радиусом отсечки 0,06 нм состояния системы, полученные в ходе метадинамики, по конформации десмикозиновой части конъюгата, и отобрали состояния, наиболее близкие к центрам шести наиболее заселенных кластеров. Каждое из них послужило исходным состоянием для равновесной динамики.

Расчёт равновесной динамики состоял из двух этапов. На первом этапе установленные ранее ограничения подвижности для онкоциновой части были плавно ослаблены до полного исчезновения в ходе 20 нс равновесной динамики. На втором этапе выполнялся расчёт 200 нс равновесной динамики, исходящей из конформации, достигнутой на первом этапе. При этом на обоих этапах ограничивалась лишь подвижность остатков рибосомы, лежащих на гранях моделируемого фрагмента, как то описывалось выше.

Полученные при этом состояния были кластеризованы методом GROMOS с радиусом отсечки 0,1 нм по конформации соединения 3 и остатков рибосомы, лежащих не дальше 1 нм от него. Состояния, относящиеся к десяти наиболее населённым кластерам, были выделены в отдельные наборы, для которых анализировались взаимодействия конъюгата с рибосомным туннелем (табл. S3). Исходя из результатов этого анализа были отобраны первый, второй и пятый кластеры. Отбор именно этих кластеров основывался на следующих соображениях. Во-первых, первый, второй, четвёртый и пятый кластеры характеризуются наивысшими энергиями нековалентных взаимодействий и населённостью. Во-вторых, для первого, и, в особенности, для четвёртого и пятого кластеров характерны многочисленные и стабильные водородные связи онкоциновой части с остатками рибосомного туннеля. В-третьих, второй и пятый кластер показывают высокую стабильность стэкинг–взаимодействий остатка Туг⁶ онкоциновой части конъюгата с основанием С2452. Третий кластер не обладает ни одним из этих достоинств и потому выбывает из дальнейшего рассмотрения. При этом четвертый и пятый кластер имеют довольно схожие конформации и взаимодействия конъюгата — поэтому из них отбирается пятый кластер как обладающий большей энергией нековалентных взаимодействий и стабильнейшими водородными связями.

Центроиды первого, второго и пятого кластеров были вовлечены в следующий

расчёт равновесной молекулярной динамики. Анализ взаимодействий в полученных траекториях позволяет выбрать кластер 5 как располагающий наивысшей энергией нековалентных взаимодействий между конъюгатом и рибосомой и стабильнейшими водородными связями при сохраняющемся стэкинг–взаимодействии онкоцинового фрагмента с C2452 (табл. S4). Именно эта конформация рассматривается нами как структура комплекса **3** с рибосомой *E. coli*. При изучении эффекта мутации A2059G в построенной таким образом структуре заменялось соответствующее азотистое основание.

KPPY-DES(Ac)₃ (1)

При моделировании соединения **1** использовали полученную выше структуру комплекса **3** с рибосомой *E. coli*, из онкоцинового фрагмента которой удаляли N–концевые остатки валина и аспарагиновой кислоты. В ходе молекулярно-динамического моделирования этилальдегидная группа была ковалентно связана с экзоциклической аминогруппой основания A2062 с образованием карбиноламина. При изучении эффекта мутации A2059G в построенной таким образом структуре заменялось соответствующее азотистое основание.

5. Дополнительные рисунки S4–S6

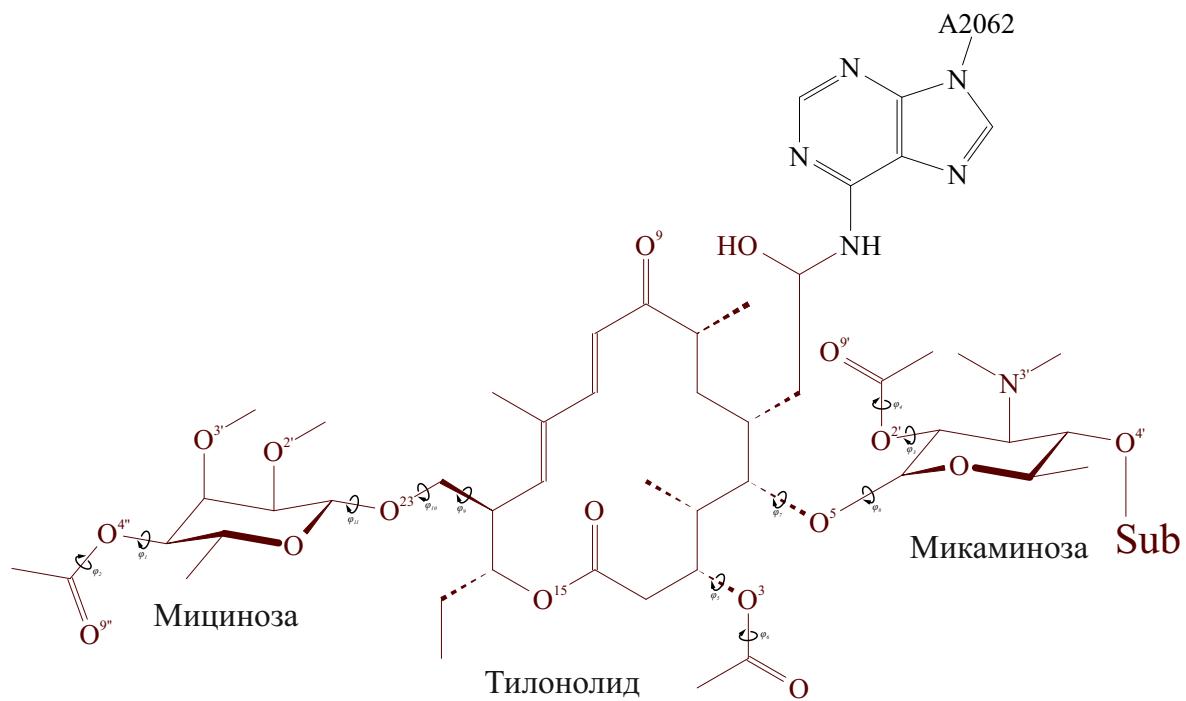


Рисунок S4. Торсионные углы, использованные при расчётах метадинамики для соединения 3. Пептидный фрагмент онкоцина ¹VDKPPY⁶, связанный с микаминозой через 4-амиnobутановую кислоту, обозначен как «Sub». Показана ковалентная связь между альдегидной группой тилонолида и остатком A2062 23S рРНК, присутствовавшая в ходе расчётов.

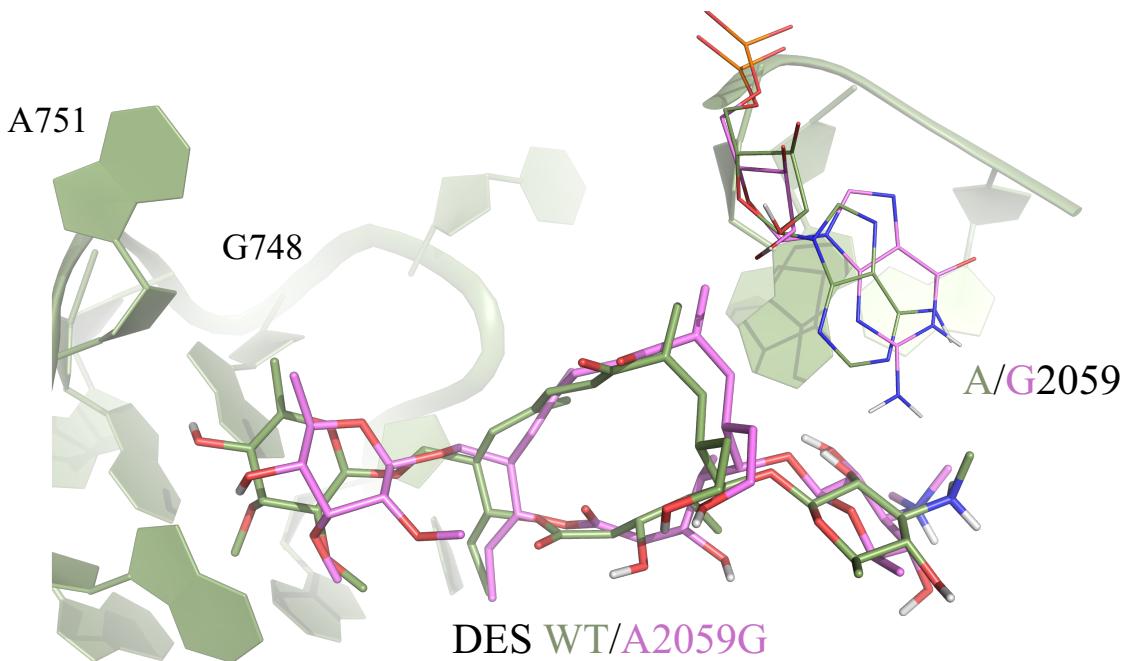


Рисунок S5. Наложение структур десмикозина в комплексе с рибосомой *E. coli* дикого типа (WT, зеленый) и с рибосомой *E. coli*, содержащей мутацию A2059G в 23S pPHK (лиловый), полученных в результате молекулярно-динамических расчётов.

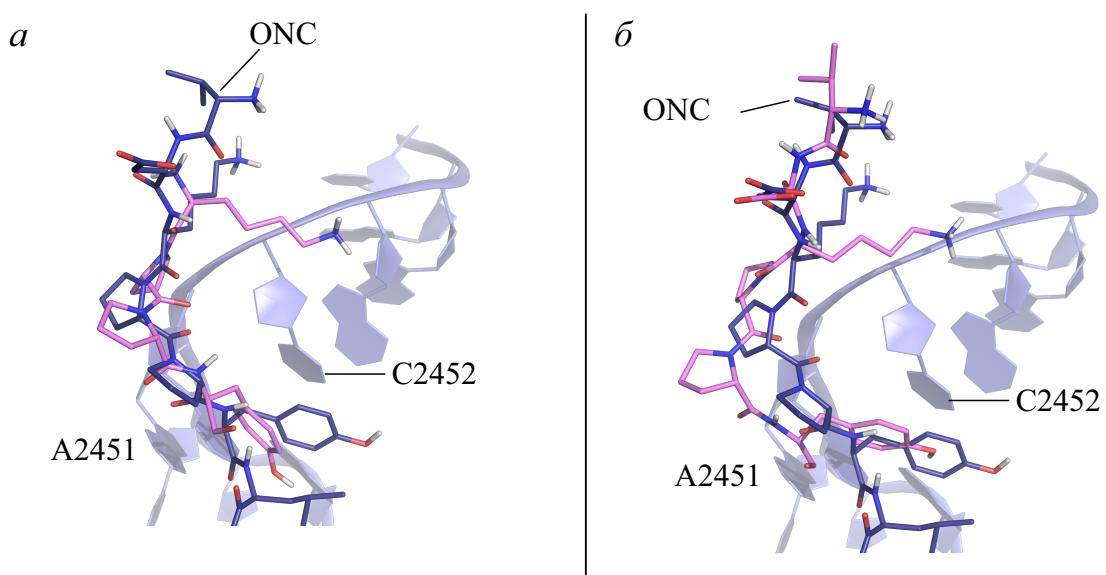


Рисунок S6. Взаимодействие онкоциновых фрагментов соединений **1** и **3** с рибосомой *E. coli* дикого типа по данным молекулярно-динамических расчётов. *a* – Наложение структур конъюгата **1** (лиловый), полученной методом молекулярной динамики, и ONC (тёмно-синий), взятой из результатов рентгеноструктурного анализа (код PDB: 4Z8C). *б* – Наложение структур конъюгата **3** (лиловый), полученной методом молекулярной динамики, и ONC (тёмно-синий), взятой из результатов рентгеноструктурного анализа (код PDB: 4Z8C).

6. Дополнительные таблицы S2–S6

Таблица S2. Протяженность и количество траекторий, полученных при моделировании комплексов десмикозина и его производных с рибосомой *E. coli* дикого типа (WT) и содержащей мутацию A2059G.

Моделируемое производное	Операция	Количество траекторий	Протяженность траекторий, нс
DES (WT)	Равновесная динамика	1	200
DES (A2059G)	Равновесная динамика	1	200
VDKPPY–DES (WT)	Равновесная динамика	1	200
VDKPPY–DES (A2059G)	Равновесная динамика	1	200
KPPY–DES (WT)	Равновесная динамика	1	200
KPPY–DES (A2059G)	Равновесная динамика	1	200
ONC (WT)	Равновесная динамика	1	200
ONC (A2059G)	Равновесная динамика	1	200
VDKPPY–DES(Ac) ₃ (3, WT)	Метадинамика с обменом репликами	6	200
	Моделирование основных кластеров из метадинамики	6	200
	Моделирование выбранных конформаций	3	200
VDKPPY–DES(Ac) ₃ (3, A2059G)	Равновесная динамика	1	200
KPPY–DES(Ac) ₃ (1, WT)	Равновесная динамика	1	200
KPPY–DES(Ac) ₃ (1, A2059G)	Равновесная динамика	1	200

Таблица S3. Сравнение взаимодействий соединения 3 с рибосомой *E. coli* между конформациями, полученными при моделировании основных кластеров, выделенных из траекторий метадинамических симуляций. Жирным выделены кластеры, выбранные для дальнейшего рассмотрения..

Донор	Акцептор	Водородные связи, % кадров											
		Кластер 1	Кластер 2	Кластер 3	Кластер 4	Кластер 5	Кластер 6	Кластер 7	Кластер 8	Кластер 9	Кластер 10	Кластер 4+5	
Стэкинг-взаимодействия, % кадров													
C-2452	Тир-6	95	0	1	6	81	4	48	64	3	34	37	
<i>E</i> , кДж/моль		-535	-547	-451	-595	-707	-464	-435	-284	-384	-440	-642	
Населенность кластера		5427	4777	3520	3365	2412	2050	2022	2002	1888	1866	5777	

Таблица S4. Сравнение взаимодействий соединения **3** с рибосомой *E. coli* между избранными конформациями. Жирным выделен кластер, выбранный в качестве структуры комплекса VDKPPY-DES(Ac)₃ (**3**) с рибосомой *E. coli*.

Донор	Акцептор	Кластер 1	Кластер 2	Кластер 5
Водородные связи, % кадров				
DES/Val-1/N-H	C-2507/O _{2'}	0	0	82
U-2555/N ³ -H	DES/Val-1/O	25	0	0
C-2507/O _{2'} -H	DES/Asp-2/O _δ	1	4	39
C-2507/O _{2'} -H	DES/Asp-2/O _{δ'}	1	5	52
G-2553/N ¹ -H	DES/Asp-2/O _δ	23	1	59
G-2553/N ¹ -H	DES/Asp-2/O _{δ'}	23	8	48
G-2553/N ² -H	DES/Asp-2/O _δ	5	4	44
G-2553/N ² -H	DES/Asp-2/O _{δ'}	4	6	57
G-2583/N ² -H	DES/Asp-2/O _δ	1	0	27
G-2583/N ² -H	DES/Asp-2/O _{δ'}	2	0	32
DES/Lys-3/N _ε -H	C-2507/O	5	56	89
DES/Lys-3/N _ε -H	C-2573/O	25	1	98
DES/Tyr-6/N-H	U-2506/O ²	0	80	0
DES/Tyr-6/O ₄ -H	C-2452/N ³	27	0	0
G-2061/N ² -H	DES/Tyr-6/O	0	0	25
U-2585/N ³ -H	DES/Tyr-6/O	29	0	0
DES/GABA-7/N-H	U-2506/O ²	0	58	0
G-2061/N ² -H	DES/GABA-7/O	0	0	30
G-748/N ¹ -H	DES/Мициноза/O ^{4''}	10	0	23
G-748/N ¹ -H	DES/Мициноза/O ^{9''}	0	99	0
Lys-90/N _ε -H	DES/Мициноза/O ^{9''}	17	0	2
A-2058/N ⁶ -H	DES/Тилонолид/O ⁹	28	0	0
A-2058/N ⁶ -H	DES/Микаминоза/O ^{2'}	0	0	13
G-2505/N ² -H	DES/Микаминоза/O ^{9'}	15	0	0
Стэкинг-взаимодействия, % кадров				
C-2452	DES/Tyr-6	73	0	48
<i>E</i> , кДж/моль		-482	-562	-757
Населенность кластера		5110	6668	4560

Таблица S5. Встречаемость водородных связей, образованных десмикозином и его фрагментами в составе конъюгатов десмикозина с N-концевыми пептидами онкоцина в комплексах с рибосомами *E. coli* дикого типа (WT) и содержащей мутацию A2059G, по данным молекулярно-динамических расчетов. Встречаемость состояний дана в % от кадров траекторий.

Донор	Акцептор	DES (WT)	DES (A2059G)	VDKPPY-DES (WT)	VDKPPY-DES (A2059G)	KPPY-DES (WT)	KPPY-DES (A2059G)	VDKPPY-DES(Ac) ₃ (3, WT)	VDKPPY-DES(Ac) ₃ (3, A2059G)	KPPY-DES(Ac) ₃ (1, WT)	KPPY-DES(Ac) ₃ (1, A2059G)
Мициноза/O _{4''} -H	A-751/O _{2'}	74	2	67	-	-	-	-	-	-	-
Мициноза/O _{4''} -H	G-748/O ⁶	88	-	76	93	75	95	-	-	-	-
Микаминоза/N _{3'} -H	G-2505/N ⁷	-	60	-	-	-	-	-	-	-	-
Микаминоза/N _{3'} -H	G-2505/O _{4'}	73	2	-	1	1	-	-	3	-	1
Микаминоза/O _{2'} -H	A-2058/N ¹	94	35	51	42	89	90	-	-	-	-
A-751/O _{2'} -H	Мициноза/O _{4''}	-	-	-	80	66	82	-	-	-	-
A-752/N ⁶ -H	Мициноза/O _{9''}	-	-	-	-	-	-	-	35	-	18
G-748/N ¹ -H	Мициноза/O _{3''}	96	4	83	96	81	97	-	-	1	4
G-748/N ¹ -H	Мициноза/O _{4''}	-	-	-	-	-	-	23	9	52	7

Таблица S6. Встречаемость водородных связей, образованных онкоцином и его фрагментами в составе конъюгатов десмикозина с N-концевыми пептидами онкоцина в комплексах с рибосомами *E. coli* дикого типа (WT) и содержащей мутацию A2059G, по данным молекулярно-динамических расчетов. Встречаемость состояний дана в % от кадров траекторий.

Список литературы

1. Hansen, P. R., Oddo, A. (2015) Fmoc solid-phase peptide synthesis, *Methods in Molecular Biology*, **1348**, 33–50, doi: 10.1007/978-1-4939-2999-3_5.
2. Eissler, S., Kley, M., Bächle, D., Loidl, G., Meier, T., Samson, D. (2017) Substitution determination of fmoc-substituted resins at different wavelengths, *J. Pept. Sci.*, **23**, 757–762, doi: 10.1002/jsc.3021.
3. Coin, I., Beyermann, M., Bienert, M. (2007) Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences, *Nature Protocols*, **2**, 3247–3256, doi: 10.1038/nprot.2007.454.
4. Kaiser, E., Colescott, R., Bossinger, C., Cook, P. (1970) Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Anal. Biochem.*, **34**, 595–598, doi: 10.1016/0003-2697(70)90146-6.
5. van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A., Berendsen, H. (2005) GROMACS: fast, flexible, free, *J. Comput. Chem.*, **26**, 1701–1718, doi: 10.1002/jcc.20291.
6. van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Kutzner, C. (2008) GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation, *J. Chem. Theory Comput.*, **4**, 435–447, doi: 10.1021/ct700301q.
7. Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., Simmerling, C. (2015) Ff14sb: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99sb, *J. Chem. Theory and Comput.*, **11**, 3696–3713, doi: 10.1021/acs.jctc.5b00255.
8. Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., Case, D. A. (2004) Development and testing of a general amber force field, *J. Comput. Chem.* **25**, 1157–1174. doi: 10.1002/jcc.20035.
9. Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W., Kollman, P. A. (1993) A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model, *J. Phys. Chem.*, **97**, 10269–10280, doi: 10.1021/J100142A004.
10. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., Fraaije, J. G. E. M. (1997) LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations, *J. Comput. Chem.*, **18**, 1463–1472, doi: 10.1002/%28SICI%291096-987X%28199709%2918%3A12%253C1463%3A%3AAID-JCC4%253E3.0.CO%3B2-H.
11. Bussi, G., Donadio, D., Parrinello, M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling, *J. Chem. Phys.*, **126**, 014107–014106, doi: 10.1063/1.2408420.

12. Berendsen, H., Postma, J., Gunsteren, W. van, DiNola, A., Haak, J. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.*, **81**, 3684–3690, doi: 10.1063/1.448118.
13. Darden, T., York, D., Pedersen, L. (1993) Particle mesh Ewald: an $N \log(N)$ method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.*, **98**, 10089–10092, doi: 10.1063/1.464397.
14. Horn, H. W., Swope, W. C., Pitera, J. W., Madura, J. D., Dick, T. J., Hura, G. L., Head-Gordon, T. (2004) Development of an improved four-site water model for biomolecular simulations: tip4p-ew, *J. Chem. Phys.*, **120**, 9665–9678, doi: 10.1063/1.1683075.
15. Joung, I. S., Cheatham, T. E. (2008) Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 9020–9041, doi: 10.1021/jp8001614.
16. Athavale, S., Petrov, A., Hsiao, C., Watkins, D., Prickett, C., Gossett, J., Lie, L., Bowman, J., O'Neill, E., Hud, C. B. N., Wartell, R., Harvey, S., Williams, L. (2012) RNA folding and catalysis mediated by iron (II), *Plos One*, **7**, 1–7, doi: 10.1371/journal.pone.0038024.
17. Daura, X., Gademann, K., Jaun, B., Seebach, D., Gunsteren, W. F. van, Mark, A. E. (1999) Peptide folding: when simulation meets experiment, *Angewandte Chemie International Edition*, **38**, 236–240, doi: 10.1002/%28SICI%291521-3773%2819990115%2938%3A1%2F2%3C236%3A%3AAID-ANIE236%3E3.0.CO%3B2-M.
18. Dunkle, J. A., Xiong, L., Mankin, A. S., 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, doi: 10.1073/pnas.1007988107.
19. Cannone, J. J., Subramanian, S., Schnare, M. N., Collett, J. R., D’Souza, L. M., Du, Y., Feng, B., Lin, N., Madabusi, L. V., Müller, K. M., Pande, N., Shang, Z., Yu, N., Gutell, R. R. (2002) The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs, *BMC Bioinformatics*, **3**, 1–31, doi: 10.1186/1471-2105-3-2.
20. Byrd, R., Lu, P., Nocedal, J. (1995) A limited memory algorithm for bound constrained optimization, *SIAM J. Scientif. Statistic. Comput.*, **16**, 1190–1208, doi: 10.1137/0916069.
21. Petrone, P., Snow, C., Lucent, D., Pande, V. (2008) Side-chain recognition and gating in the ribosome exit tunnel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16549–16554, doi: 10.1073/pnas.0801795105.

22. Lucent, D., Snow, C., Aitken, C., Pande, V. (2010) Non–bulk–like solvent behavior in the ribosome exit tunnel, *PloS Comput. Biol.*, **6**, e1000963, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000963.
23. Hansen, J., Ippolito, J., Ban, N., Nissen, P., Moore, P., Steitz, T. (2002) The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit, *Mol. Cell*, **10**, 117–128, doi: 10.1016/S1097-2765%2802%2900570-1.
24. Ruiz-Carmona, S., Alvarez-Garcia, D., Foloppe, N., Garmendia-Doval, A. B., Juhos, S., Schmidtke, P., Barril, X., Hubbard, R. E., Morley, S. D. (2014) rDock: a fast, versatile and open source program for docking ligands to proteins and nucleic acids, *PLoS Comput. Biol.*, **10**, e1003571, doi: 10.1371/journal.pcbi.1003571.
25. Roy, R. N., Lomakin, I. B., Gagnon, M. G., Steitz, T. A. (2015) The mechanism of inhibition of protein synthesis by the proline-rich peptide oncocin, *Nature Structural & Molecular Biology*, **22**, 466–469, doi: 10.1038/nsmb.3031.
26. Barducci, A., Bussi, G., Parrinello, M. (2008) Well-tempered metadynamics: a smoothly converging and tunable free-energy method, *Phys. Rev. Lett.*, **100**, 020603, doi: 10.1103/PhysRevLett.100.020603.
27. Domene, C., Barbini, P., Furini, S. (2015) Bias–exchange metadynamics simulations: an efficient strategy for the analysis of conduction and selectivity in ion channels, *J. Chem. Theory Comput.*, **11**, 1896–1906, doi: 10.1021/ct501053x.
28. Tribello, G. A., Bonomi, M., Branduardi, D., Camilloni, C., Bussi, G. (2014) PLUMED 2: new feathers for an old bird, *Comput. Phys. Commun.*, **185**, 604–613, doi: 10.1016/j.cpc.2013.09.018.