

Tobramycin 与 16S rRNA A 位点复合物的 分子动力学模拟

冯宇¹, 张旭东¹, 程伟贤¹, 曹槐¹, 刘次全^{1,2}

(1. 云南大学现代生物医学研究中心, 昆明 650091; 2. 中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223)

摘要 采用分子动力学方法(Molecular dynamics, MD)对托普霉素(Tobramycin)与16S rRNA的A位点复合物的特异性识别机制进行了理论模拟研究, 模拟时间为3.6 ns. 结果表明, A位点中波动最大的部位是两个环外碱基A1492和A1493; tobramycin的环I和环II是其最保守的结构单元, 可能参与了Tobramycin与16S rRNA的A位点之间的特异性识别. 另外, 发现一个残存时间为3.6 ns的“结构化”水分子, 它桥接了Tobramycin环II的N3与环I的N6'之间的氢键, 稳定了Tobramycin的结构; Tobramycin周围水合密度较高的位点出现在环I和环II附近, 这也正是晶体结构中形成较多水媒介氢键及动力学模拟中结构化水分子出现的位置. 动力学模拟证实Tobramycin与16S rRNA间的结合是大量氢键及水分子相互作用的结果, 这有助于设计和开发以Tobramycin为基础, 具有高亲和力及特异性的16S rRNA抑制剂.

关键词 分子动力学; 托普霉素; 16S rRNA A位点; 水合密度

中图分类号 O641 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2007)11-2156-06

由于RNA在与蛋白质相互识别过程中具有折叠成各种复杂的三级结构, 形成特异性的结合位点及许多病原体(如逆转录酶病毒, 在RNA链上编码其遗传信息^[1]的特征), 使RNA成为近年来新药研究和开发的热点. 因为氨基糖苷类抗生素能与原核生物16S rRNA产生特异性相互作用, 而作为抗革兰氏阳性和革兰氏阴性菌的有效药物, 并用于抗分枝杆菌的感染. 然而, 早期所研制的这类抗生素, 其毒副作用(对听力和肾功能均有损伤)随着使用剂量的增加而表现出来. 因此, 从分子水平上了解氨基糖苷类化合物与RNA的相互作用对于研究新的更具特异性的抗生素十分重要. 16S rRNA的A位点位于原核生物核糖体的30S小亚基的螺旋44的末端, 主要是由两个特殊的二级结构单元构成: 一个是由碱基A1408, A1492和A1493构成的不对称内环, 另一个是由U1406和U1495构成的非标准碱基配对. A位点在蛋白质的翻译过程中起到关键性的作用, 对氨酰tRNA的特异性识别是在该位点内进行的.

氨基糖苷类抗生素能特异性地结合于原核生物核糖体16S rRNA的A位点, 阻断正常的同源tRNA-mRNA复合物的形成, 诱导了密码子和反密码子的近同源(Near-cognate)和非同源(Non-cognate)的识别和配对, 最终导致翻译过程中的错误配对的增加和翻译精度的下降^[2,3]. 绝大多数氨基糖苷类抗生素的化学结构中都包含一个共同的2-Dos(2-deoxystreptamine)子结构(图1), 带有不同取代基团的环I总是与2-DOS环在4位相连而形成新毒胺核心. 附加的环结构与2-DOS在5位或6位相连, 分别形成了新霉素(Neomycin)和卡那霉素(Kanamycin)子类.

目前, 通过核磁共振^[4-8]和X射线晶体衍射^[9-12]实验成功地解析了一些天然氨基糖苷类抗生素与解码A位点或整个30S核糖体亚基的复合物结构. 这为在分子水平上了解天然氨基糖苷类抗生素与rRNA解码A位点的特异性识别机制提供了重要线索. 分子动力学模拟可模拟分子随时间运动的细节, 可以发现模拟体系内的一些特殊问题, 这比实验更为简便.

Tobramycin作为氨基糖苷类化合物中与新毒胺核心(Neamine core)在6位相连的主要化合物, 其

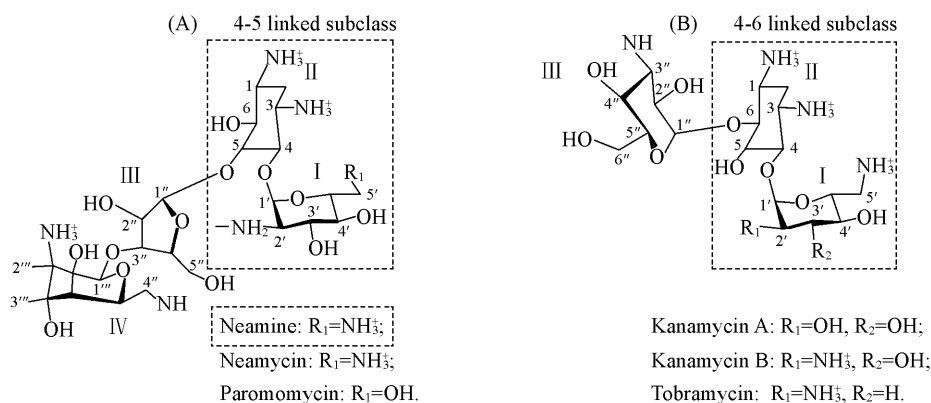


Fig. 1 Chemical structures of the aminoglycosides

(A) 4-5 Disubstituted 2-Dos(2-deoxystreptamine) derivatives neomycin B, paromomycin and Neamine;

(B) 4-6 disubstituted 2-Dos derivatives; kanamycin A, kanamycin B and tobramycin.

与 16S rRNA 的 A 位点结合复合物的晶体结构已有文献报道^[12]. 本文通过分子动力学模拟方法对 Tobramycin 与 16S rRNA 的 A 位点作用过程中的结构和动力学特征进行了综合分析.

1 动力学模拟部分

1.1 动力学模拟体系的选取

用于分子动力学模拟的复合物坐标参数选自 Tobramycin 与 16S rRNA 的 A 位点复合物的晶体结构 (PDB 代码 1LC4)^[12]. 初始晶体结构中的多聚核苷酸模型包含两个相同的 A 位点, 并且在每个位点都有一个 Tobramycin 分子与其结合. 为了在模拟中比较有无 Tobramycin 结合时 A 位点构象的差别, 我们去掉了两个位点的 Tobramycin. 图 2 为经处理后的多聚核苷酸二级结构模式及晶体结构示意图.

1.2 动力学模拟过程

所有动力学模拟计算都是在 AMBER 8.0 程序^[13]中完成. 晶体结构中缺失的氢原子使用 AMBER 程序的 LEAP 模块加载, RNA 磷酸骨架的负电荷通过加 Na^+ 中和. 将复合物置于边长为 8.721 nm 的立体水箱中心, 并选择溶质原子到水箱壁的距离为 1 nm, 然后加入类型为 TIP3P 的水分子, 模拟体系包含 32331 个原子, 其中有 1425 个溶质原子, 10290 个水分子和 36 个 Na^+ 离子.

分子动力学模拟使用 SANDER 模块以及标准的 Cornell 等^[14]的力场参数来完成. SHAKE 算法用来限制所包含氢原子的键长. 周期性边界条件和 2 fs 的时间步长应用于整个动力学模拟过程中. 体系的温度和压强分别恒定在 300 K 和 1.01325×10^5 Pa (一个标准大气压), 范德华相互作用截断半径取 1.0 nm, 静电相互作用采用 PME 算法^[15], 网格空间约为 0.1 nm.

在初始结构中加入水分子和 Na^+ 后, 使用 209340 kJ/(mol · nm²) 的力常数固定 RNA、小分子和 Na^+ , 对所加的溶剂水分子进行 1000 步的能量优化. 然后再固定 RNA 和小分子, 对溶剂水和 Na^+ 进行 1000 步的能量优化. 优化后的结构用 8373.6 kJ/(mol · nm²) 的力常数固定 RNA 和小分子, 对所加的溶剂水分子及 Na^+ 进行 40 ps 的平衡动力学模拟. 平衡后的结构再使用 8373.6 kJ/(mol · nm²) 力常数固定 RNA 和小分子, 对所加的溶剂水分子及 Na^+ 进行 1000 步的能量优化和 10 ps 的平衡动力学模拟. 重复上述步骤, 将限制 RNA 和小分子的力常数每次减少 2093.4 kJ/(mol · nm²), 直到力常数为零时止. 最后, 为了将体系的温度缓慢地由 0 K 升至 300 K, 在恒体积条件下先进行 20 ps 的升温动力学模拟, 并随之在恒压条件下进行 100 ps 的平衡动力学模拟.

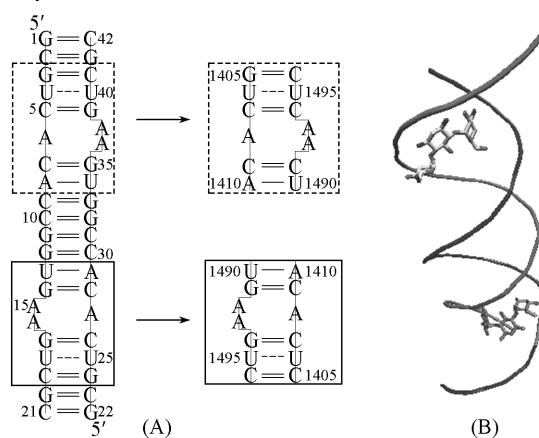


Fig. 2 Schematic diagram of 16S rRNA A site models

(A) Secondary structure of the crysallized 16S rRNA A site fragment; (B) three-dimensional structure of complex.

在体系温度由 0 K 升至 300 K 后,进行了 3.6 ns 的采样动力学模拟(Production dynamic simulation). 轨道坐标保存间隔为 1 ps, 将用作进一步的动力学分析. 使用的分析工具主要包括 Grace 程序、VMD^[16] 程序、UCSF chimera^[17] 程序及 Insight II 等.

通过计算水合密度(Hydration density)确定水合位点(Hydration site). 首先,以 MD 模拟使用的水箱的中心为起点建立一个 10 nm × 10 nm × 12 nm 的立方体空间. 然后,将这个立方体分成多个体积为 0.05 nm × 0.05 nm × 0.05 nm 的正方体小网格,并以溶剂水分子的氧原子为检验原子进行探测. 以氧原子重心落入小网格的次数作为衡量水合密度大小的标准. 立方体内的每个小网格类似于一个计数器,通过统计所有动力学模拟轨道中水氧原子重心落入小网格内的次数来确定最终的水合密度值.

2 结果与讨论

2.1 动力学分析和体系结构特征

图 3(A) 为体系平均结构与晶体结构的均方根偏差(Rootmean square deviation, RMSD) 随时间的变化图. 从图 3(A) 可以看出,动力学模拟的复合物平均结构与晶体结构(1LC4) 之间的均方根偏差值在处于稳定状态时仅为 0.15 nm. 体系达到稳定状态. 图 3(B) 给出了 A 位点的原子波动(Rootmean square fluctuation, RMSF) 在整个动力学模拟过程中的变化,图 3(B) 中括号内是在活细胞内 A 位点的碱基序号. 从图 3(B) 可以看出,去掉 tobramycin 的 A 位点的两个环外堆积碱基 A15 和 A16 与结合有 tobramycin 的 A 位点的两个环外堆积碱基 A36(A1492) 和 A37(A1493) 的构象均有较大变化,这说明 16S rRNA A 位点的这两个碱基在与 tobramycin 相互识别过程中起到了关键作用,其构象变化诱导了 tobramycin 与 A 位点的结合,是 A 位点内波动较大的部分.

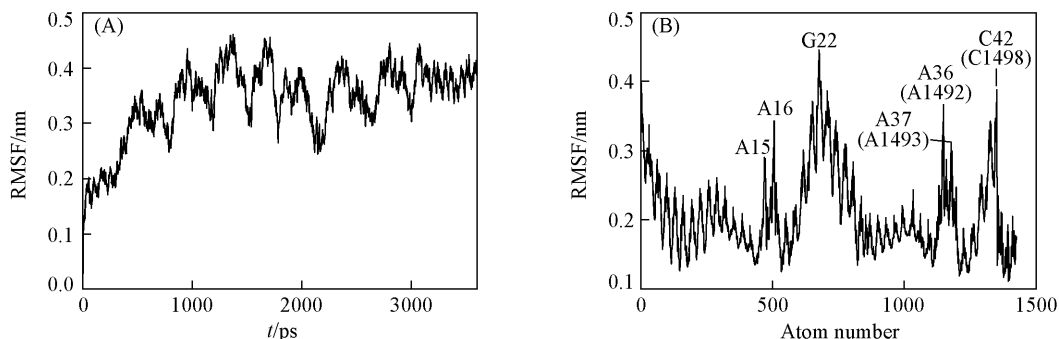


Fig. 3 Time course of the RMSD(A) and FMSF(B) of tobramycin-16S rRNA A site complex

虽然 G22 与 C42 及其周围碱基的原子波动也很大,这可能是由于处于所模拟模型的链末端,没有别的碱基与之相互作用,而 AMBER 程序在处理这种链末端的碱基时可能会产生较大的误差. 另一方面,由于所取晶体结构为模拟的活细胞 16S rRNA A 位点所构建的模型系统,而处于模型末端的 8 个碱基(图 2 中位于虚线框标示的活性部位最上方及最下方的碱基)在活体内并不存在,因此对其波动的分析也无实际意义.

2.2 Tobramycin 与 16S rRNA A 位点之间的直接氢键相互作用

从 Tobramycin 与 A 位点复合物在模拟过程 RMSD 变化分析可知,3 ~ 3.6 ns 的复合结构在动力学行为上处于稳定的平衡阶段[图 3(A)]. 通过使用氢键距离 [$r(D \cdots A) \leq 0.35$ nm] 和角度 ($120^\circ \leq D-H \cdots A \leq 180^\circ$) 限制性条件,对 Tobramycin 与 16S rRNA 的 A 位点之间形成的稳定氢键进行了分析.

表 1 统计了动力学模拟过程中最后 600 ps 所有轨道占据(Occupancy) $\geq 30\%$ 的氢键. 从表 1 可以看出, Tobramycin 与 A 位点之间总共形成 7 个氢键(图 4), 其在 Tobramycin 中的分布情况是环 I 和环 II 所构

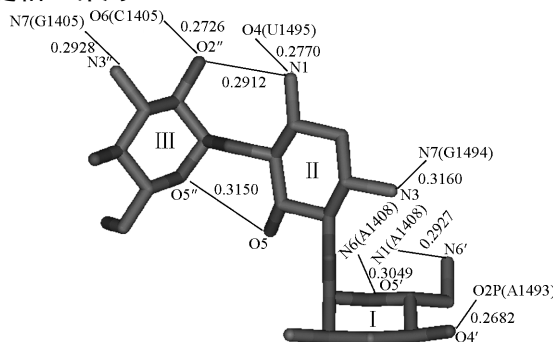


Fig. 4 Hydrogen bond in molecular dynamic simulation (bond distance/nm)

成的新毒胺核心占 5 个, 环 III 有 2 个. 环 II 与 A 位点形成的二个氢键分别作用于 G1494 与非标准配对的碱基 (U1495), 轨道占据率分别为 49.50% 和 56.67%, 说明环 II 在最后 600 ps 的稳定平衡阶段是稳定和保守的. 环 I 与 A 位点形成的 3 个氢键中, N1 (A1408)⋯N6' 轨道占据率为 98%, N6 (A1408)⋯O5' 轨道占据率为 95.67%, O2P (A1493)⋯O4' 轨道占据为 66.83%. 事实上, 环 I 和环 II 是绝大多数氨基糖苷类抗生素的共有成分, 是这一类抗生素在结构上的保守单元, 既然包含环 I 和环 II 的氨基糖苷类抗生素都能与 A 位点进行特异性识别^[18-21], 则环 I 和环 II 在与 A 位点相互作用的过程中应该是保守和稳定的. 同时, 环 II 和环 III 所形成的两个稳定的分子内氢键也起到了维持化合物结构稳定的作用, 因而在总体上提高了 tobramycin 与 A 位点复合物的稳定性和结合亲和力.

Table 1 Trajectory occupancy of hydrogen bond in molecular dynamic simulation (occupancy $\geq 30\%$)

Atom-atom	Occupancy (%)	MD distance/nm	Angle/(°)
N1 (A1408)⋯N6'	98.00	0.2927	29.13
N6 (A1408)⋯O5'	95.67	0.3049	20.45
O6 (C1405)⋯O2''	75.83	0.2726	26.84
O2P (A1493)⋯O4'	66.83	0.2682	14.69
O4 (U1495)⋯N1	56.67	0.277	22.70
N7 (G1405)⋯N3''	51.17	0.2928	21.58
N7 (G1494)⋯N3	49.50	0.3160	19.32
N1⋯O2'' (Inner hydrogen bond of ligand)	49.00	0.2912	30.22
O5⋯O5'' (Inner hydrogen bond of ligand)	32.67	0.315	29.21

Table 2 Comparison of H-bond distances between X-ray and MD simulation

Atom-atom	X-ray distance/nm	MD distance/nm
N1 (A1408)⋯N6'	0.314	0.2927
N6 (A1408)⋯O5'	0.293	0.3049
O6 (C1405)⋯O2''	0.277	0.2726
O2P (A1493)⋯O4'	0.255	0.2682
O4 (U1495)⋯N1	0.256	0.277
N7 (G1405)⋯N3''	0.271	0.2928
N7 (G1494)⋯N3	0.272	0.316
N1⋯O2''	0.298	0.2912
O5⋯O5''	0.322	0.315
N3⋯O1P (A1493)	0.305	—
N3⋯O2P (G1494)	0.255	—

动力学模拟计算得到的 Tobramycin 与 A 位点之间稳定的氢键基本与实验得到的晶体结构相符 (表 2). 从表 2 可见, 虽然动力学模拟计算所得到的氢键距离也处在形成氢键的有效距离之内, 但其大小仍有变化, 如新毒胺核心 (环 I 和环 II) 与 A 位点形成的 5 个直接氢键中有 4 个的距离有所增加, 这有可能影响新毒胺核心与 A 位点的特异性识别, 而同时形成的两个分子内氢键, 距离却相应减小, 稳定了 Tobramycin 的环结构, 在这一此消彼长的过程中, 使 Tobramycin 能与 A 位点进行相互识别和作用.

2.3 结构化水分子及其形成的水媒介氢键分析

“结构化”的水分子一般具有较长的水残存时间 (Residence time), 容易形成水媒介氢键. 通过分析动力学模拟发现了一个水残存时间几乎达到 3.6 ns 的水分子.

图 5 显示了所有水分子在 3.6 ns 时的动力学模拟过程中的原子波动. 其中水分子 104 (Water 104) 的波动最小, 平均波动仅为 0.15 nm, 在模拟过程中表现出很高的稳定性. 为了确定 Water 104 在 Tobramycin 和 A 位点碱基间桥接的水媒介氢键, 我们同样使用氢键距离 [$r(D\cdots A) \leq 0.35$ nm] 和氢键角度 ($135^\circ \leq D-H\cdots A \leq 180^\circ$) 两个限制性条件, 对 Water 104 在 3.6 ns 模拟轨道内形成的轨道占据率 $\geq 30\%$ 的氢键进行了分析 (表 3). 从表 3 可以看出, Water 104 桥接了 Tobramycin 的环 II 上的 N3 原子与环 I 上的 N6' 原子之间的氢键.

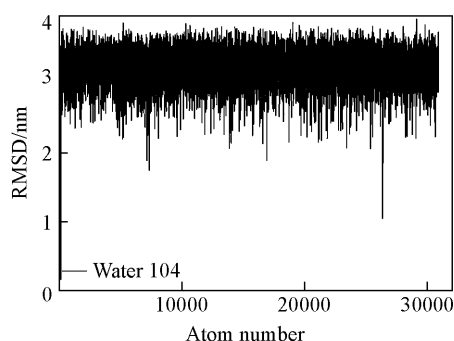


Fig. 5 Time course of the RMSF of water molecules along simulation trajectory

Table 3 Trajectory occupancy of water-media H-bonds in molecular dynamic simulation (occupancy $\geq 30\%$)

Donor	Acceptor H	Acceptor	Occupancy (%)	Bond distance/nm	Bond angle/(°)
N3	Water 104 (H1)	O (Water 104)	30.14	0.2821	19.34
N3	Water 104 (H2)	O (Water 104)	48.81	0.2828	19.45
O (Water 104)	Ring I N6' (H93)	N6'	39.86	0.2853	24.94
O (Water 104)	Ring I N6' (H95)	N6'	31.17	0.2829	22.45

由表3可以看到, N3和N6'与Water 104之间总的氢键轨道占据率分别为78.95%和71.03%,在3.6 ns的动力学模拟过程中处于相对稳定的状态, N3与Water 104上的H1, H2和Water 104上的O与N6'上的H93和H95形成相对稳定的氢键相互作用(图6).

由于N3和N6'是分别作为氢键供体与氢键受体与Water 104形成氢键的, 由轨道占据不可能确定它们与Water 104所形成的氢键在模拟轨道内是否连续存在. 为此又对N3(环II)和N6'(环I)与Water 104所形成氢键的距离和角度进行了分析(图7). 结果表明, N3和N6'与Water 104氧原子的距离在3.6 ns的模拟过程中都处于非常适合的氢键作用范围内(0.3 nm左右). 但从成键角度看, 无论是H1和H2, 还是H93和H95, 都是在适合的氢键角度范围内交替地与N3和N6'形成氢键. 这说明Water 104在Tobramycin和A位点间桥接的两个水媒介氢键在时间上是连续的, 都是稳定存在的.

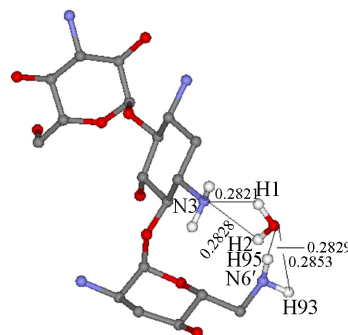


Fig. 6 Water-media-hydrogen bond in molecular dynamic simulation

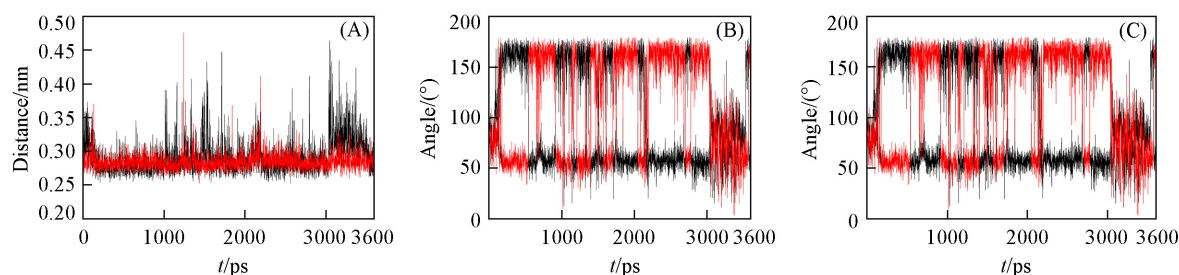


Fig. 7 Time course of hydrogen-bond distance of N3-water 104 (black), N6'-water 104 (red) (A), hydrogen-bond angle of N3—H1/H2—O water 127 (B), hydrogen-bond angle of N6'—H93/H95—O water 127 (C)

分析文献[12]中的晶体衍射数据可知, tobramycin环II的N3原子分别与A位点不对称内环上的O1P(A1493), N7(G1494)和O2P(G1494)产生直接氢键相互作用. 环I的N6'则与A位点不对称内环的N1(A1408)和O2P(G1494)产生直接氢键相互作用.

生化实验^[22~24]结果表明, 包含环I和环II的氨基糖苷类抗生素都能与A位点进行特异性识别. 而晶体衍射数据所提供的数据显示环I和环II与A位点保守的二级结构单元(A1408, A1493不对称内环)产生氢键相互作用. 而我们所找到的结构化水分子Water 104正好位于这一区域, 桥接了N3和N6'之间的水媒介氢键, 稳定了环I和环II的构象. 鉴于Water 104在整个模拟过程中高的轨道占据和长的残存时间, 可以认为, Water 104通过稳定Tobramycin环I和环II的结构, 使Tobramycin能与A位点进行特异性的结合和识别.

2.4 水合位点分析

动力学模拟过程中, 除了发现具有长的水残存时间的Water 104外, 在Tobramycin与A位点的结合区域内还发现了多个具有高的水合密度的水合位点. 虽然这些水合位点由于发生频繁的水分子交换而使单个水分子表现出较低的水残存时间, 但是它们的存在对维持Tobramycin与A位点复合物的稳定性起了重要作用.

图8显示了Tobramycin周围水合密度截断值为70的水合位点. 从图8可以看出, Tobramycin的环I和环II之间有一个较高水合密度的区域, 这正是结构化水分子Water 104桥接N3和N6'形成水媒介氢键的位置. 而位于环I的N2'附近也有较高的水合密度, 这与晶体结构所测定的形成水媒介氢键集中的区域一致.

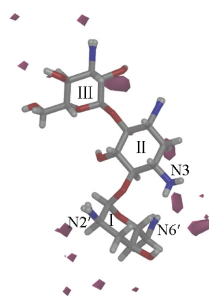


Fig. 8 Overall hydration site of tobramycin (water density cutoff is 70)

参 考 文 献

- [1] Walter E., Vicens Q., Westhof E. . *Curr. Opin. Chem. Biol.* [J], 1999, **3**: 694—704
- [2] Rodnina M. V., Daviter T., Gromadski K., *et al.* . *Biochim. J.*, 2002, **84**: 745—754
- [3] Pape T., Wintermeyer W., Rodnina M. V. . *Nat. Struct. Biol.* [J], 2000, **7**: 104—107
- [4] Recht M. I., Fourmy D., Blanchard S. C., *et al.* . *J. Mol. Biol.* [J], 1996, **262**: 421—436
- [5] Fourmy D., Yoshizawa S., Puglisi J. D. . *J. Mol. Biol.* [J], 1998, **277**: 333—345
- [6] Fourmy D., Recht M. I., Puglisi J. D. . *J. Mol. Biol.* [J], 1998, **277**: 347—362
- [7] Lynch S. R., Puglisi J. D. . *J. Mol. Biol.* [J], 2001, **306**: 1037—1058
- [8] Jiang L., Patel D. . *J. Nat. Struct. Biol.* [J], 1998, **5**: 769—774
- [9] Carter A. P., Clemons. W. M., Brodersen. D. E., *et al.* . *Nature*[J], 2000, **407**: 340—348
- [10] Vicens Q., Westhof E. . *J. Mol. Biol.* [J], 2003, **326**: 1175—1188
- [11] Vicens Q., Westhof E. . *Structure*(Camb.) . [J], 2001, **9**: 647—658
- [12] Vicens Q., Westhof E. . *Chem. Biol.* [J], 2002, **9**: 747—755
- [13] Case D. A., Darden T. E., Cheatham T. E. III. *et al.* . *Amber 8*[CP], San Francisco: University of California, 2005
- [14] Cornell W. D., Cieplak P., Bayly C. I., *et al.* . *P. A. J. Am. Chem. Soc.* [J], 1995, **117**: 5179—5197
- [15] York D. M., Darden T. A., Pedersen L. G. . *J. Chem. Phys.* [J], 1993, **99**: 8345—8348
- [16] Humphrey W., Dalke A., Schulten K. . *J. Molec. Graphics.* [J], 1996, **14**: 33—38
- [17] Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., *et al.* . *J. Comput. Chem.* [J], 2004, **25**: 1605—1612
- [18] Nunns C. L., Spence L. A., Slater M. J., *et al.* . *J. Tetrahedron Lett.* [J], 1999, **40**: 9341—9345
- [19] Recht M. I., Douthwaite S., Dahlquist K. D., *et al.* . *J. Mol. Biol.* [J], 1999, **286**: 33—43
- [20] Blanchard S. C., Fourmy D., Eason R. G., *et al.* . *J. D. Biochemistry*[J], 1998, **37**: 7716—7724
- [21] Simonsen K. B., Ayida B. K., Vourloumis D., *et al.* . *Chembiochem.* [J], 2002, **3**: 1223—1228
- [22] Nunns C. L., Spence L. A., Stater M. J., *et al.* . *Totrahedron Lett.* [J], 1999, **40**: 9341—9345
- [23] Recht M. I., Douthwaite S., Dehlquist K. D., *et al.* . *J. Mol. Biol.* [J], 1999, **286**: 33—43
- [24] Blanchard S. C., Eason R. C., Puglisi J. D. . *Biochemistry*[J], 1998, **97**: 7716—7724

Molecular Dynamics Simulation on the Complex of the Tobramycin and 16S rRNA A Site

FENG Yu¹, ZHANG Xu-Dong¹, CHENG Wei-Xian¹, CAO Huai¹, LIU Ci-Quan^{1,2*}

(1. *Modern Biological Research Center, Yunnan University, Kunming 650091, China;*

2. *Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)*

Abstract A 3.6 ns molecular dynamics simulation was carried out on the complex system of tobramycin and 16S rRNA in order to understand the speciality recognition mechanism between tobramycin and 16S rRNA at the molecular level. The results demonstrate that two looped out bases(A1492 and A1493) of the A site is the flexible part, while ring I and ring II of tobramycin are the most conservative elements. Moreover, ring I and ring II of tobramycin may be function conservative unit which may participate in the specificity recognition for tobramycin binding to the 16S rRNA A site. In addition, a structural water molecule was detected during the whole MD simulation trajectory, which bridged the contacts between ring II (N3) and ring I (N6') of tobramycin and enhanced the rigid of tobramycin structure. There is one hydration site with the higher water density in the vicinity of ring I and ring II of tobramycin. This result is consistent with the crystal structure detected that the most water-medial hydrogen bonds were listed in the same situation. Our study illustrates that recognition mechanism between tobramycin and 16S rRNA A site was due to a few hydrogen bond and water molecule interactions, which play a great role in designing high affinity and speciality inhibitors of 16S rRNA A site based on tobramycin.

Keywords Molecular dynamics; Tobramycin; 16S rRNA A site; Hydration density (Ed.: Y, I)