

На правах рукописи



Суковатый Лев Алексеевич

**МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ
ОСМОЛИТОВ НА СТРУКТУРУ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЮЦИФЕРАЗ**

1.5.2. Биофизика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Красноярск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), г. Красноярск.

Научный руководитель: **Немцева Елена Владимировна**,
кандидат физико-математических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Максимов Георгий Владимирович**,
доктор биологических наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва, профессор кафедры биофизики биологического факультета

Седов Игорь Алексеевич,
доктор химических наук, доцент
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, ведущий научный сотрудник Химического института им. А.М. Бутлерова

Ведущая организация: Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН), г. Пушкино Московской области

Защита диссертации состоится «30» января 2024 года в 15:00 на заседании диссертационного совета 24.1.228.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ФИЦ КНЦ СО РАН и на сайте <https://www.ibp.ru>

Автореферат разослан «___» декабря 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета, к.б.н.



Дементьев Дмитрий Владимирович

Общая характеристика работы

Актуальность темы

Понимание молекулярных механизмов влияния осмолитов на функционирование ферментов в настоящее время ещё не сформировалось окончательно. Между тем, выяснение этих механизмов важно для получения целостной картины организации метаболизма клеток, находящихся в неблагоприятных условиях, а также для определения связи динамических свойств белков с их функциональной активностью (соотношение структура-динамика-функция) и роли низкомолекулярных соединений в этом соотношении. Кроме того, прояснение молекулярных механизмов действия осмолитов поможет усовершенствовать технологии их использования в фармакологии, биомедицине и других областях, где требуется сохранение в течение длительного времени нативных свойств белков, клеток и тканей.

Накопление осмолитов – низкомолекулярных соединений различной химической природы, является известной стратегией живых организмов, применяемой для выживания в стрессовых условиях (при неоптимальной температуре, солёности, давлении и др.) [1-3]. Органические осмолиты, которые подразделяют на три группы (аминокислоты, метиламины и полиолы с сахарами), влияют на клеточный осмос и играют ключевую роль в поддержании объема клеток, их окислительно-восстановительного баланса и накоплении энергии. Однако ключевым свойством осмолитов, из-за чего их также называют «химическими шаперонами», считается повышение термодинамической стабильности биологических макромолекул в растворах, противодействие неправильному сворачиванию и агрегации белков под действием температурных или химических факторов [4-6]. Специфические молекулярные взаимодействия осмолитов, обеспечивающие стабильность белков, принято подразделять на прямые (непосредственное образование водородных связей между белком и осмолитом) и косвенные (изменение структуры и динамики воды, приводящее к усилению гидрофобных взаимодействий в системе) [7-8], и последним отводится главная роль в производимом осмолитами эффекте. Считается, что полиолы и сахара относятся к так называемым совместимым осмолитам, то есть их стабилизирующее действие не влияет на функциональные свойства белков [9]. Однако взаимосвязь между стабилизацией белков осмолитами и ее последующим влиянием на активность ферментов изучена мало, и имеются данные о снижении скоростей ферментативных реакций в растворах с сахарами, но не полиолами [10]. Таким образом, вопрос, как совмещается защитная функция разных осмолитов с ферментативной функцией белков, в настоящее время можно признать открытым.

Биolumинесцентные реакции широко используются в аналитических методах [11-12], в связи с чем подходы для получения стабильных и высокоактивных ферментов-люцифераз представляют, в том числе, и практический интерес. Не так давно было детально изучено действие на кинетику реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, ряда осмолитов из класса полиолов и сахаров [13-14]. Это позволило выявить стадии реакции, для которых изменение скорости зависит от типа присутствующего в среде осмолита, что может объясняться специфическими эффектами исследованных полиолов и сахаров на структурно-динамические характеристики люциферазы. Однако с помощью экспериментальных методов достаточно сложно исследовать конформационную динамику белка и

специфику его взаимодействия с разными низкомолекулярными соединениями. При этом применение полноатомного моделирования белка в различном окружении, вычисление молекулярной динамики такой системы позволяют проанализировать взаимное влияние молекул белка, воды и осмолита на структурные и динамические свойства друг друга, и последние годы это активно используется исследователями [15-16]. Результаты полноатомного моделирования дополняют экспериментально полученные данные о функционировании ферментов в присутствии осмолитов и помогают объяснить механизмы наблюдаемых эффектов сред на биолюминесцентную реакцию бактерий [17-18].

Целью работы являлось определение роли структурно-динамических механизмов в эффектах осмолитов (полиолов и сахаров) на функциональные свойства бактериальной люциферазы, методами молекулярной динамики.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить изменение общих структурно-динамических характеристик бактериальной люциферазы (компактность, подвижность основной цепи, стабильность укладки, площадь поверхности) в присутствии осмолитов.
2. Определить эффекты осмолитов на характеристики функционально важных участков структуры люциферазы (активный центр, мобильная петля, индивидуальные аминокислотные остатки).
3. Проанализировать влияние осмолитов на состав гидратного слоя бактериальной люциферазы и на энергию взаимодействия между компонентами моделируемой системы.
4. Сопоставить наблюдаемые изменения структурно-динамических характеристик люциферазы с известным влиянием осмолитов на функциональные свойства этого фермента.
5. На основе сравнения эффектов осмолитов на бактериальные люциферазы двух подсемейств (из *Photobacterium leiognathi* и *Vibrio harveyi*) выявить универсальные и специфические механизмы воздействия полиолов и сахаров.

Научная новизна

В работе впервые проведен анализ молекулярных механизмов влияния осмолитов класса полиолов и сахаров на структурно-динамические характеристики крупных димерных белков на примере двух бактериальных люцифераз, для чего был использован метод молекулярной динамики. Также впервые проведена реконструкция трехмерной структуры бактериальной люциферазы *P. leiognathi* («быстрой» люциферазы), исследованы её структурно-динамические свойства и выполнено сравнение с характеристиками известной кристаллической структуры люциферазы *V. harveyi* («медленной» люциферазы). Впервые выявлены корреляции между значениями каталитической константы фермента – бактериальной люциферазы *P. leiognathi* – в средах с осмолитами и энергией взаимодействий в системе белок-вода-осмолит.

Теоретическая и практическая значимость

Исследование вносит вклад в понимание взаимосвязи между стабилизацией белков осмолитами и их влиянием на ферментативную функцию белков, что является важной фундаментальной задачей на пути установления особенностей организации метаболизма клеток в условиях выживания под действием неблагоприятных факторов среды.

Полученные результаты обладают практической значимостью, поскольку могут быть использованы для улучшения функциональных характеристик биоаналитических методов, основанных на ферментативных реакциях вообще и биолюминесцентных реакциях в частности, а также в других областях биомедицины и биотехнологии, где требуется обеспечение длительного хранения функционально активных биологических макромолекул, клеток, тканей.

Положения, выносимые на защиту

1. Эффект осмолитов (полиолов и сахаров) на функционирование бактериальной люциферазы обусловлен способностью проникновения их молекул в полость активного центра, а также взаимодействием с заряженными и полярными аминокислотными остатками белка.
2. Значение каталитической константы бактериальной люциферазы *P. leiognathi* проявляет корреляцию с энергией электростатического взаимодействия белка с осмолитами (полиолами и сахарами) и с энергией ван-дер-ваальсовых взаимодействий молекул осмолитов друг с другом или с водой.
3. Замедление термоинактивации бактериальной люциферазы сахарозой обусловлено снижением динамики мобильной петли фермента вследствие взаимодействия молекул осмолита с заряженными и полярными аминокислотными остатками фермента.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены в виде докладов на следующих научных конференциях: VI Съезде биофизиков России (16-21 сентября 2019 г., г. Сочи), конкурсе-конференции научных работ молодых ученых Института Биофизики СО РАН (31 марта 2021 г., г. Красноярск), XXVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов–2021» (12-23 Апреля 2021, г. Москва), XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспектив–2021» (19-24 апреля 2021 г., г. Красноярск), Международной мультikonференции «Биоинформатика геномной регуляции и структурной/системной биологии» – BGRS/SB-2022 (4-8 июля 2022 г., г. Новосибирск), а также на научных семинарах кафедры биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии СФУ и лаборатории биолюминесцентных биотехнологий СФУ.

В 2021 г. работа была отмечена стипендией Фонда Осаму Шимомура за успешное исследование в области биолюминесценции.

Диссертационное исследование было поддержано Российским фондом фундаментальных исследований в рамках конкурса «Аспиранты» (проект № 20-34-90118) и Российским фондом фундаментальных исследований совместно с Правительством Красноярского края в рамках региональных конкурсов научных исследований, выполняемых молодыми учеными (проекты № 20-44-243002 и №18-44-243009).

Личный вклад соискателя. Представленные в работе результаты были получены либо автором самостоятельно, либо при его непосредственном участии. Автор принимал участие во всех этапах исследования: от постановки цели и задач, выбора методов до проведения расчетов с последующим анализом, обобщением и интерпретацией результатов.

Достоверность полученных результатов подтверждена достаточным объемом данных, их воспроизводимостью, а также использованием современных методов исследования и статистического анализа при проведении научной работы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 8 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах Web of Science и/или Scopus и рекомендуемых ВАК России.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, содержащих обзор литературы, описание методов исследования и результатов, заключения. Полный объем работы – 141 страница текста, содержащего 52 рисунка и 14 таблиц. Список литературы состоит из 173 наименований.

Диссертация соответствует паспорту специальности **1.5.2. Биофизика** (физико-математические науки) (пп. 1.1, 1.2).

Основное содержание работы

Глава 1. Взаимодействие осмолитов с белками и применение методов молекулярного моделирования для его изучения (обзор литературы)

В первой главе представлен обзор публикаций по современному состоянию проблемы. Обсуждается роль осмолитов в живой клетке, сольватационные эффекты, влияющие на структурно-функциональные характеристики белков, а также подходы к моделированию внутриклеточного окружения ферментов с помощью методов молекулярной динамики (МД). Последняя часть обзора литературы посвящена структурно-функциональным особенностям двух бактериальных люцифераз – *Vibrio harveyi* и *Photobacterium leiognathi*.

Анализ публикаций показал, что возможны разные виды взаимодействий в системе фермент-субстрат-осмолит, и характер влияния осмолитов на биохимические процессы может быть обусловлен большим количеством механизмов и факторов. В частности, низкомолекулярные соединения могут специфично взаимодействовать с функционально важными участками белковой глобулы. К изменению кинетики ферментативных реакций может приводить изменение подвижности сегментов структуры белка, ориентации боковых цепей аминокислотных остатков, проникновение молекул осмолитов в активный центр и др. [19-20]. Присутствие осмолитов может нарушать организацию воды в первом гидратном слое фермента, что влияет на его каталитическую активность, поскольку, находясь в непосредственной близости от поверхности белка, молекулы воды играют важную роль в процессах молекулярного распознавания, связывания или высвобождения лигандов [21-22]. Современные методы теоретического моделирования позволяют на атомном уровне описать эффекты среды на структуру и, как следствие, функцию белков. На сегодняшний день метод молекулярной динамики, основанный на расчёте классических (ньютоновских) траекторий движения макромолекул в фазовом пространстве координат и импульсов их атомов, является одним из самых популярных подходов при изучении свойств различных структур, от белков и биополимеров до нанотрубок [23].

Исследования пространственной структуры бактериальной люциферазы, представляющей собой гетеродимер, состоящий из уложенных в ТИМ-бочонок субъединиц, в подавляющем большинстве случаев проводились для фермента из *V. harveyi* [24-25]. Используя расшифрованную кристаллическую структуру этого белка

и метод направленного мутагенеза, определили функционально важные для биolumинесцентной реакции структурные участки фермента [26-27]. Однако влияние низкомолекулярных соразтворителей (в частности, осмолитов) на структуру бактериальной люциферазы до настоящего времени не было исследовано, ни экспериментальными, ни вычислительными методами.

Глава 2. Методы исследования

Глава включает в себя описание методов и подходов, использованных при выполнении диссертационного исследования.

Трёхмерная структура бактериальной люциферазы *V. harveyi* была получена из белкового банка данных (PDB ID: 3FGC). Неразрешенные сегменты: участок мобильной петли α -субъединицы (283–290 а.о.) и С-конец β -субъединицы (319–324 а.о.), были достроены с помощью программного пакета MODELLER [28]. Полученная структура была использована в качестве шаблона для реконструирования по гомологии трёхмерной структуры люциферазы *P. leiognathi*, с помощью веб-сервиса SWISS-MODEL [29].

Молекулярное моделирование структур бактериальных люцифераз в окружении молекул воды и осмолитов было проведено с помощью программного пакета GROMACS 2020.04 [30]. Для описания межатомных взаимодействий было использовано силовое поле CHARMM36 [31]. Параметры для расчета МД были выбраны согласно рекомендациям [30]. Молекулы белка, воды и осмолитов были представлены в явном виде. Был проведён расчет МД для структур ферментов в окружении молекул воды и смесей молекул воды и осмолитов (этиленгликоля, глицерина, сорбитола, глюкозы и сахарозы). Соотношение компонентов каждой смеси соответствовало концентрации осмолита 40 вес.%. Также было проведено моделирование ферментов в окружении разных концентраций глицерина или сахарозы: 5, 10, 20, 30 вес.%. До запуска расчета молекулярного моделирования были проведены стандартные этапы энергетической минимизации и релаксации, направленные на приведение моделируемых систем к температуре 300 К и давлению 10^5 Па. Для моделирования структуры люцифераз при 5, 15, 45 и 60 °С, температура системы была зафиксирована при 278, 288, 318, 333 К соответственно.

Также было проведено моделирование МД субстратов биolumинесцентной реакции бактерий NADH и FMN. Трёхмерные структуры субстратов были взяты из библиотеки низкомолекулярных соединений CHARMM36. Силовое поле и другие параметры моделирования были аналогичны параметрам, использованным для люцифераз.

Обработку полученных молекулярно-динамических траекторий проводили с помощью встроенных плагинов GROMACS. Полость активного центра люцифераз определяли с помощью веб-сервиса CASTp [32], а объём активного центра фермента и его доступность для молекул осмолитов за время МД – с помощью плагина *trj_cavity* 2.0.

Анализ гидратного слоя бактериальных люцифераз и нуклеотидов в присутствии осмолитов был проведён с помощью модуля *Complex-Mixtures.jl* [33].

Длительность моделируемой молекулярной динамики составляла 100 нс. Было проведено по три независимых запуска каждого вычислительного эксперимента,

включая все этапы подготовки. Визуализация полученных результатов была проведена в UCSF Chimera 1.15 [34].

Глава 3. Структурно-динамические характеристики бактериальных люцифераз в присутствии осмолитов

В главе представлено сравнение структурных и динамических характеристик люцифераз *V. harveyi* и *P. leiognathi*, а также эффектов, производимых осмолитами этиленгликолем (62 Да), глицерином (92 Да), глюкозой (180 Да), сорбитолом (182 Да) и сахарозой (342 Да) на эти характеристики.

Была впервые реконструирована по гомологии пространственная структура люциферазы *P. leiognathi*, с использованием кристаллической структуры фермента *V. harveyi* (PDB ID: 3FGC) в качестве шаблона. Структурное выравнивание реконструированной β -субъединицы относительно расшифрованной ранее кристаллической структуры (PDB ID: 6FRI) показало хорошее соответствие: расхождение элементов не превышает 1-2 Å по всей последовательности.

Сравнение структур двух люцифераз выявило, что доли упорядоченных аминокислотных остатков для них приблизительно равны (47-48% – в α -спиралях и около 15% – в β -тяжах). Сопоставление положения структурированных участков полипептидной цепи с предсказанной веб-сервисом PONDR упорядоченностью на основе аминокислотной последовательности позволило выявить потенциально нестабильные участки глобулы. Оказалось, что β -субъединица люциферазы *V. harveyi* содержит в С-домене более длинный фрагмент с пониженной стабильностью, чем фермент *P. leiognathi*, что согласуется с экспериментальными данными по денатурации этих белков мочевиной [35].

Было проведено моделирование молекулярной динамики двух люцифераз в окружении молекул воды и смеси воды с осмолитами (~40%). На основе полученных молекулярно-динамических траекторий были рассчитаны параметры: среднеквадратичное отклонение (RMSD) C_{α} -атомов, радиус инерции белка (R_g) и площадь поверхности, доступной растворителю, (SASA) (Рисунок 1).

Видно, что в присутствии этиленгликоля наблюдается увеличение всех параметров, по сравнению с другими средами, что говорит о вероятном нарушении нативной структуры белковой глобулы [14]. Эффект выражен более ярко для фермента *P. leiognathi*. Аналогично были определены параметры RMSD, R_g и SASA бактериальных люцифераз в окружении разных концентраций глицерина и сахарозы (5, 10, 20 и 30%). Получено, что для обоих белков значения параметров в присутствии осмолитов мало изменяются относительно значений в водном окружении: отклонение в ходе моделирования составляет 5-10%. Таким образом, не было выявлено концентрационных эффектов глицерина или сахарозы на компактность глобулы бактериальных люцифераз [13].

Состояние гидратного слоя люцифераз в присутствии осмолитов изучали с помощью функции распределения минимального расстояния (MDDF), которую рассчитывали на разных расстояниях от поверхности белка r для молекул осмолитов (g_{pc}) и молекул воды (g_{pw}). Получено, что профили g_{pc} и g_{pw} не зависят от типа люциферазы и осмолита: первый максимум находится при $r=1,8$ Å, что соответствует области первого гидратного слоя белка (Рисунок 2). g_{pw} в отсутствие осмолитов для обеих люцифераз практически совпадают (черная кривая на рисунке 2, Б). Это

говорит о том, что поверхности люцифераз в целом схожи и обладают близкими конформационными и электростатическими характеристиками.

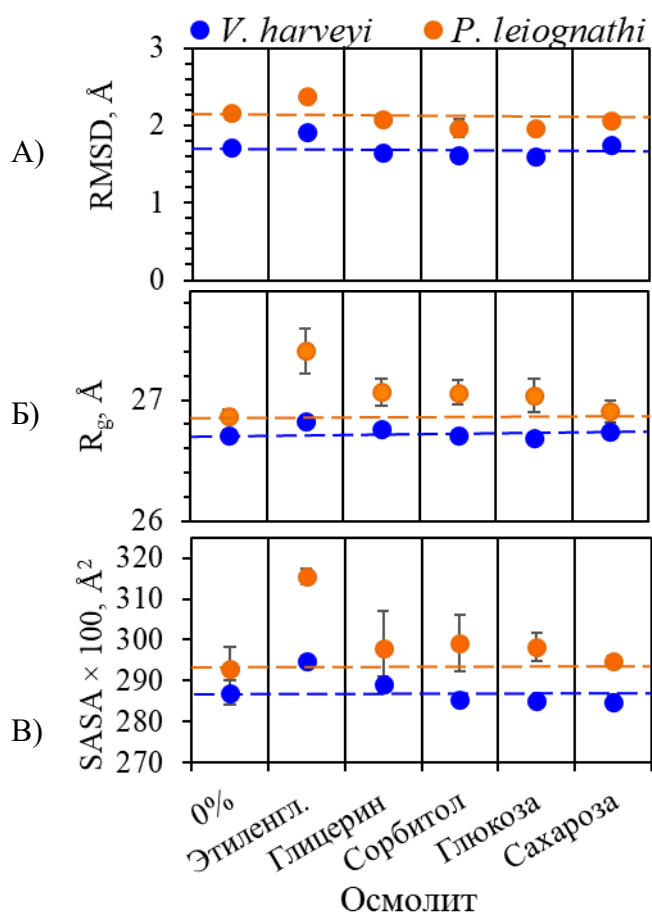


Рисунок 1 – Значение RMSD (А), R_g (Б) и SASA (В) для люцифераз *V. harveyi* (синие маркеры) и *P. leiognathi* (оранжевые маркеры) в воде (0%) и смесях с осмоситами (40%). Показаны усредненные значения (точки) и стандартное отклонение (планки погрешностей) за последние 20 нс молекулярной динамики.

Причиной этого может быть насыщение сайтов связывания осмоситов на поверхности белка и невозможность образовывать водородные связи с еще большим числом молекул глицерина или сахарозы.

Функция MDFF (g_{pc} и g_{pw}) была также рассчитана для разных концентраций глицерина и сахарозы относительно заряженной и нейтральной поверхностей белков. Получено, что профиль g_{pc} около незаряженной поверхности для глицерина имеет два примерно равнозначных пика при 1,8 и 2,7 $\text{\AA}$, а для сахарозы первый пик имеет большую амплитуду, чем второй. Это может говорить о том, что сахароза, не смотря на большой молекулярный размер, способна подойти на более близкое расстояние к незаряженной поверхности люцифераз, чем глицерин. Также установлено, что с ростом концентрации осмоситов изменяется соотношение пиков в профиле g_{pw} около незаряженной поверхности, свидетельствуя о том, что молекулы воды вероятно

Присутствие осмоситов увеличивает гидратированность поверхности белков: пик g_{pw} становится выше, и эффект не зависит от типа осмосита (Рисунок 2, Б). Однако профиль g_{pc} отличен для каждого из осмоситов (Рисунок 2, А): молекулы сахарозы имеют наибольшее значение пика при $r=1,8 \text{ \AA}$, немного ниже пики для сорбитола и глюкозы, примерно в два раза ниже – для глицерина. Профиль g_{pc} этиленгликоля отличается от всех остальных осмоситов: основной максимум наблюдается при $r=2,5 \text{ \AA}$.

Такие различия возможно вызваны тем, что молекулы осмоситов с большим размером имеют большее количество ОН-групп и, соответственно, могут более эффективно образовывать водородные связи в первом гидратном слое белка. Этиленгликоль, не смотря на свой малый размер, из-за своих гидрофобных свойств, вероятно, не может эффективно образовывать водородные связи, что приводит к наблюдаемому для него соотношению пиков g_{pc} .

Было получено, что с ростом концентрации глицерина и сахарозы значение максимума g_{pc} снижается (Рисунок 2, В), в то время как для g_{pw} наблюдается рост (Рисунок 2, Г).

покидают незаряженную поверхность на близком расстоянии (например, уступая место осмолитам), и/или занимают больше мест во втором гидратном слое (например, вытесняя оттуда осмолиты).

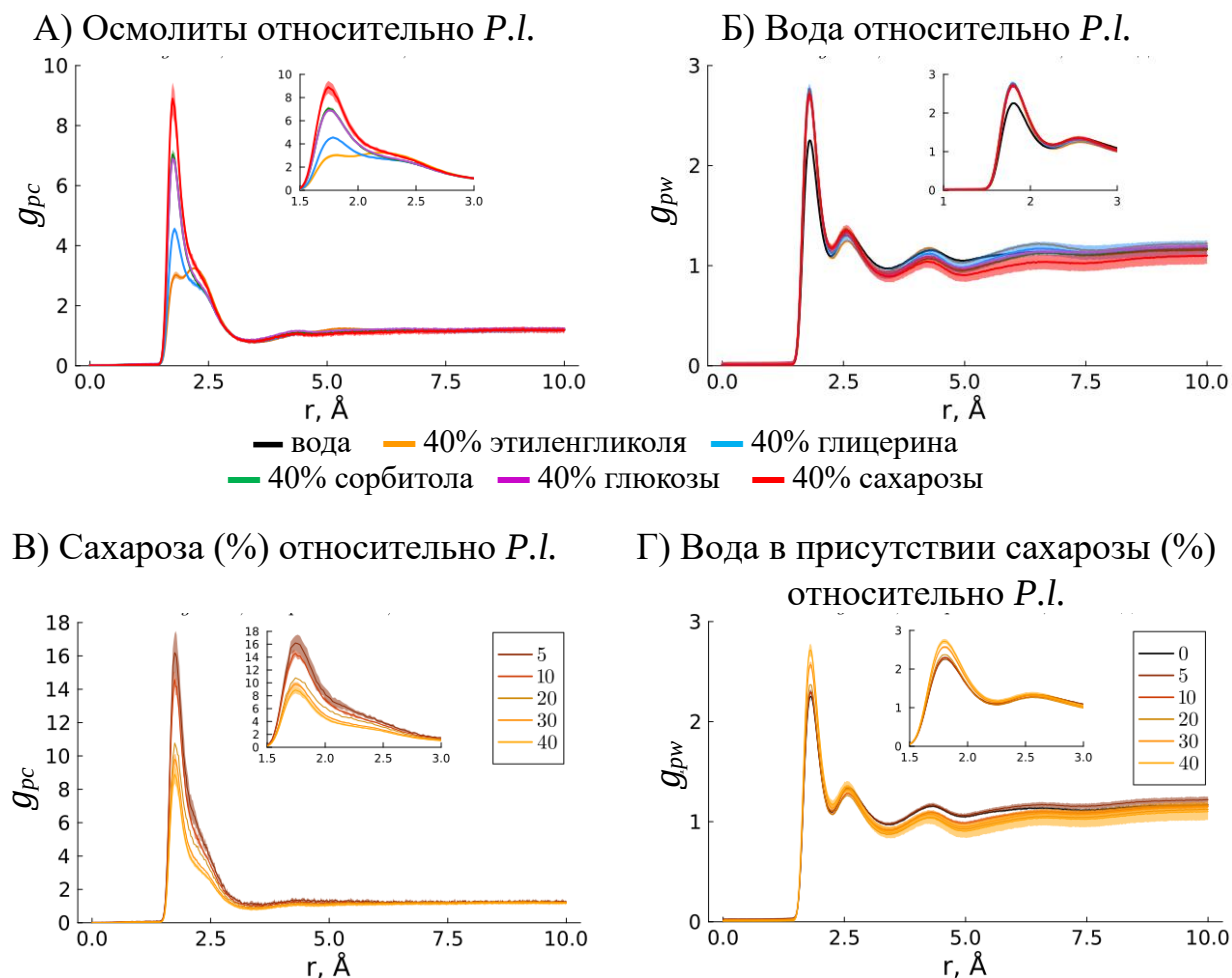


Рисунок 2 – MDDF молекул осмолитов (А, В) и воды (Б, Г) относительно поверхности люциферазы *P. leiognathi*. Рассчитано на основе МД-траекторий белка в окружении смеси молекул воды и осмолитов (40%) (А, Б) и разных концентраций сахарозы (В, Г). На врезках показана область 1,5-3 Å в более крупном масштабе. Стандартное отклонение отображено полупрозрачным коридором.

На основе функций распределения минимального расстояния были рассчитаны коэффициенты предпочтительного взаимодействия с поверхностью белка для молекул осмолитов (Γ_{rc}) и воды (Γ_{pw}) [33]. $\Gamma > 0$ означает предпочтительное взаимодействие белка с молекулами данного типа, а $\Gamma < 0$ говорит о вытеснении молекул с поверхности. Коэффициенты Γ_{rc} и Γ_{pw} для сред с разными осмолитами при максимальной концентрации приведены на рисунке 3, А, Б.

Видно, что при 40%-й концентрации сорбитола, глюкозы и сахарозы наблюдается преимущественное связывание их молекул с поверхностью люциферазы ($\Gamma_{rc} > 0$, Рисунок 3, А), в то время как молекулы воды вытесняются с поверхности ($\Gamma_{pw} < 0$, Рисунок 3, Б). В присутствии этиленгликоля и глицерина значения Γ_{pw} близки к нулю, что может говорить о некотором переходном состоянии между предпочтительной гидратацией белка и исключением молекул воды с его поверхности [36].

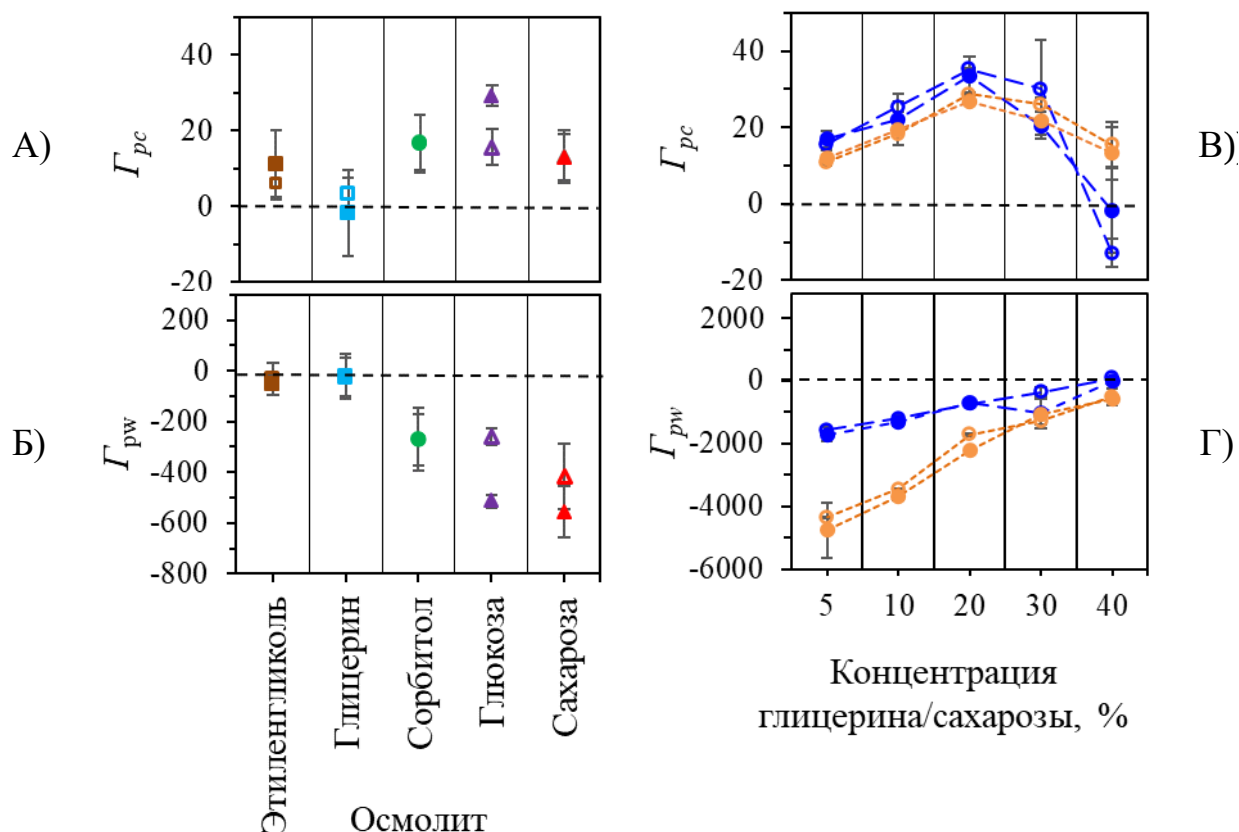


Рисунок 3 – Коэффициенты предпочтительного взаимодействия люциферазы *V. harveyi* (незакрашенные маркеры) и *P. leiognathi* (закрашенные маркеры) с осмолитами, Γ_{pc} (А, В) и водой, Γ_{pw} (Б, Г). Рассчитано на основе молекулярно-динамических траекторий белка в окружении смеси молекул воды и разных осмолитов (40%) (А, Б) и разных концентраций глицерина (синие маркеры) и сахарозы (оранжевые маркеры) (В, Г).

Согласно традиционным представлениям, осмопротекторы должны исключаться с поверхности белка с одновременным повышением уровня его гидратации [36,37]. Однако накопленные данные по разнообразным белкам показали, что взаимодействия в паре фермент-осмолит могут быть уникальны [38]. Анализ концентрационных зависимостей Γ_{pc} и Γ_{pw} двух люцифераз для моделей с глицерином и сахарозой выявил, что (i) до 20%-й концентрации наблюдается усиление эффекта предпочтительного связывания осмолитов, а затем его снижение (Рисунок 3, В), и (ii) эффект исключения воды наиболее выражен при низких концентрациях осмолитов (5%) и значительно снижается к 40%-й концентрации (Рисунок 3, Г). Аналогичные результаты, показывающие смену механизма взаимодействия белок-осмолит при повышении концентрации осмолита, были получены для лизоцима и β -лактоглобулина в окружении некоторых полиолов и дисахаридов [38]. Авторы связывают эффект исключения осмолита с поверхности белка при высоких концентрациях со способностью молекул осмолитов образовывать кластеры.

Установленные в рамках данного исследования концентрационные зависимости (Рисунок 3, В, Г) были соотнесены с эффектами сред с глицерином и сахарозой на кинетику реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi* [39]. Ускорение распада пероксифлавинового интермедиата реакции при малых концентрациях осмолитов может быть связано с эффектом преферативного

взаимодействия фермента с осмолитами и вытеснением молекул воды с поверхности белка. При более высоких концентрациях количество воды на поверхности люциферазы становится больше, и скорость распада интермедиата начинают лимитировать другие механизмы, а именно диффузионное ограничение.

На следующем этапе исследования было изучено влияние осмолитов на полость активного центра бактериальных люцифераз. Анализ каталитической полости α -субъединицы белков, проведенный с помощью веб-сервиса CASTp, показал, что объём активного центра люциферазы *V. harveyi* больше, чем фермента *P. leiognathi*, за счет наличия дополнительной полости (синяя поверхность на рисунке 4, А, Б).

На основе МД-траекторий люцифераз в модельных системах в окружении воды и 40% осмолитов был рассчитан объём активного центра ферментов в течение последних 20 нс (Рисунок 4, В). Получено, что разница в размерах каталитической полости двух люцифераз, обнаруженная для начальных структур, сохраняется и в процессе моделирования молекулярной динамики, как в водном окружении, так и в присутствии осмолитов (за исключением глицерина). Также установлено, что в присутствии полиолов объём активного центра увеличивается на $\geq 20\%$ по сравнению с водным окружением, в то время как сахара не оказывают значительного влияния на этот параметр.

Анализ количества молекул осмолитов и воды в каталитической полости ферментов показал, что в среднем в активном центре люцифераз находится 4-5 молекул этиленгликоля, 2-3 – глицерина, 1 – сорбитола или глюкозы (Рисунок 4, Г). Ни одного атома молекулы сахарозы не проникает внутрь полости, что вероятно связано с большим молекулярным размером этого осмолита. Проникновение осмолитов в полость активного центра приводит к уменьшению количества молекул воды в ней (Рисунок 4, Д): в присутствии этиленгликоля и глицерина наблюдается двукратное уменьшение, не смотря на общее увеличение объема полости. В целом, получено, что если доступ осмолитов в активный центр фермента зависит от типа люциферазы, то на количество молекул воды в полости прежде всего влияет тип осмолита, а не фермента.

Аналогичные расчеты объема и наполнения активного центра люцифераз при вариации концентрации глицерина и сахарозы (5-40%) показали, что (i) при 20-30%-м содержании осмолитов наблюдается максимальное увеличение объема активного центра ферментов по сравнению с водным окружением (на $\leq 35\%$ – для люциферазы *V. harveyi* и на $\leq 18\%$ – для *P. leiognathi*), и (ii) количество молекул глицерина в активном центре ферментов растёт пропорционально концентрации этого осмолита в среде.

Доступность отдельных сайтов активного центра люцифераз для молекул осмолитов была проанализирована путём расчета функции распределения минимального расстояния (MDDF) относительно индивидуальных аминокислотных остатков, на расстоянии от их поверхности 1,5-3,5 Å (оптимальном для образования водородной связи). Представленная на рисунке 5 изокарта отражает вклад отдельных аминокислотных остатков активного центра люцифераз в суммарное значение g_{rc} , показанное на рисунке 2, А. Появление на изокартах областей, отличных от нуля, говорит о том, что молекулы растворителя способны приближаться к соответствующему аминокислотному остатку на расстояние образования водородной связи.

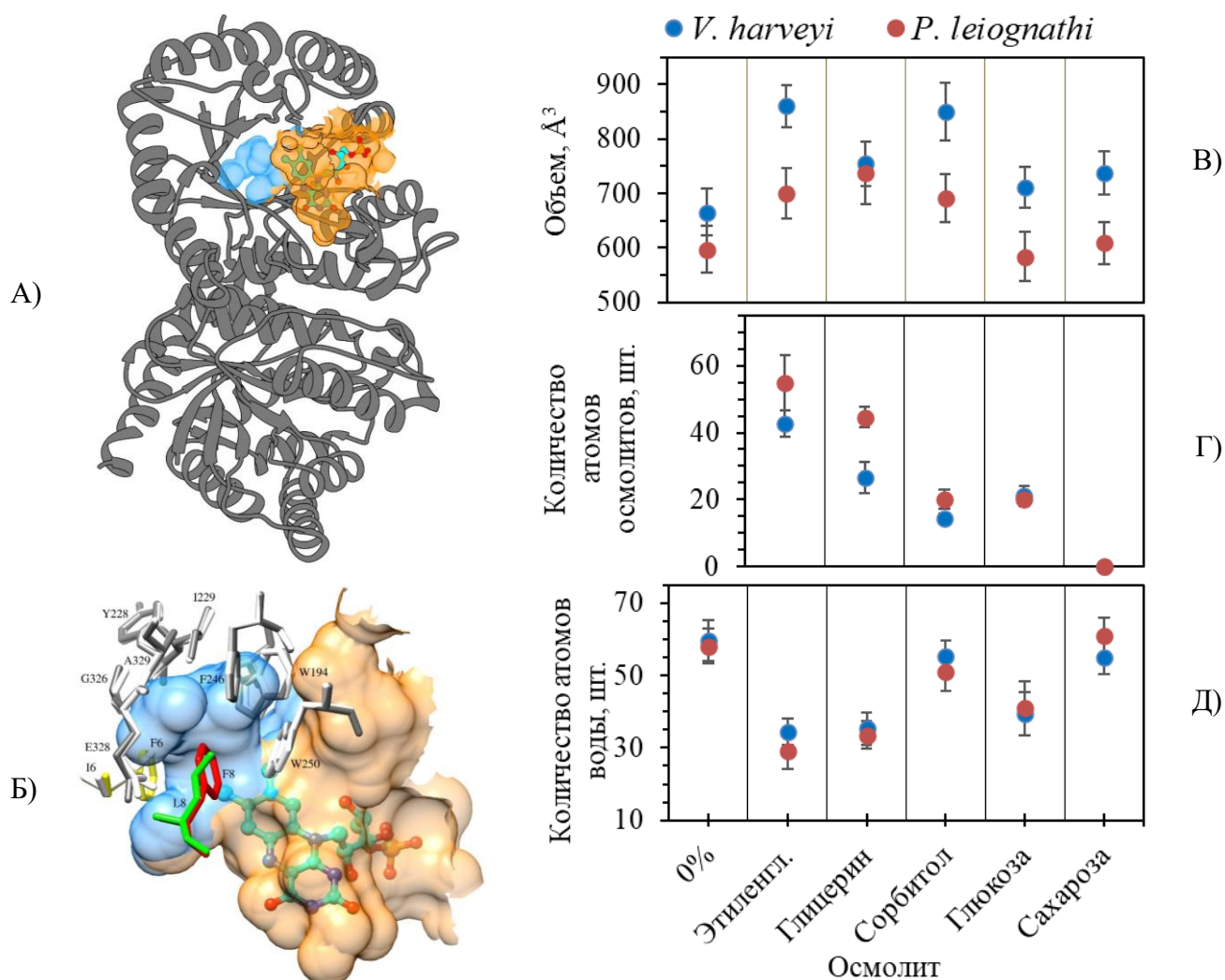


Рисунок 4 – (А): Пространственное выравнивание полостей активного центра люцифераз *V. harveyi* (синий) и *P. leiognathi* (оранжевый) относительно кристаллической структуры люциферазы *V. harveyi* (ID PDB: 3FGC) в комплексе с FMN (представление СРК). (Б): Полости активного центра крупным планом: аминокислотные остатки, формирующие дополнительную полость люциферазы *V. harveyi*, показаны в виде стержневой модели темно-серым цветом, а их аналоги у *P. leiognathi* – светло-серым цветом; желтым выделен α Phe6 *V. harveyi*, зеленым – α Leu8 *V. harveyi*, красным – α Phe8 *P. leiognathi*. Для люциферазы *V. harveyi* показана только та часть активного центра, которую при выравнивании не покрывает поверхность полости *P. leiognathi*. Участок структуры α 235-291 не отображен. (В), (Г) и (Д): объем активного центра ферментов и количество находящихся в полости атомов осмолитов и воды соответственно. Показаны средние значения (точки) и стандартное отклонение (планки погрешностей) за последние 20 нс молекулярной динамики моделей с водным окружением (0%) и 40%-й концентрацией осмолитов.

Получено, что молекулы этиленгликоля и глицерина имеют доступ к аминокислотным остаткам, формирующим дно каталитической полости люцифераз (Рисунок 5, А, Б), а для других осмолитов эта область оказывается недоступна (Рисунок 5, В-Д). Для фермента *P. leiognathi* вероятность нахождения осмолитов около дна полости оказалась выше, чем для *V. harveyi*. Схожая ситуация наблюдается и для других аминокислотных остатков сайта связывания FMN (обозначен желтой

рамкой на Рисунке 5), как в области изоаллоксазинового кольца (в позициях 75, 106 и 107), так и рибитил-фосфатного хвоста флавина (в позициях 173 и 179). То, что поверхность активного центра люциферазы *P. leiognathi* оказалась более доступна для молекул осмолитов, не смотря на меньший объем полости, вероятно, является результатом разной архитектуры каталитических полостей двух люцифераз.

Для гидрофобной области активного центра, где предположительно находится сайт связывания альдегида, (обозначенной синей рамкой на Рисунке 5) для обеих люцифераз была установлена другая тенденция: с увеличением молекулярного размера осмолитов наблюдается рост частоты их присутствия на расстоянии образования водородной связи.

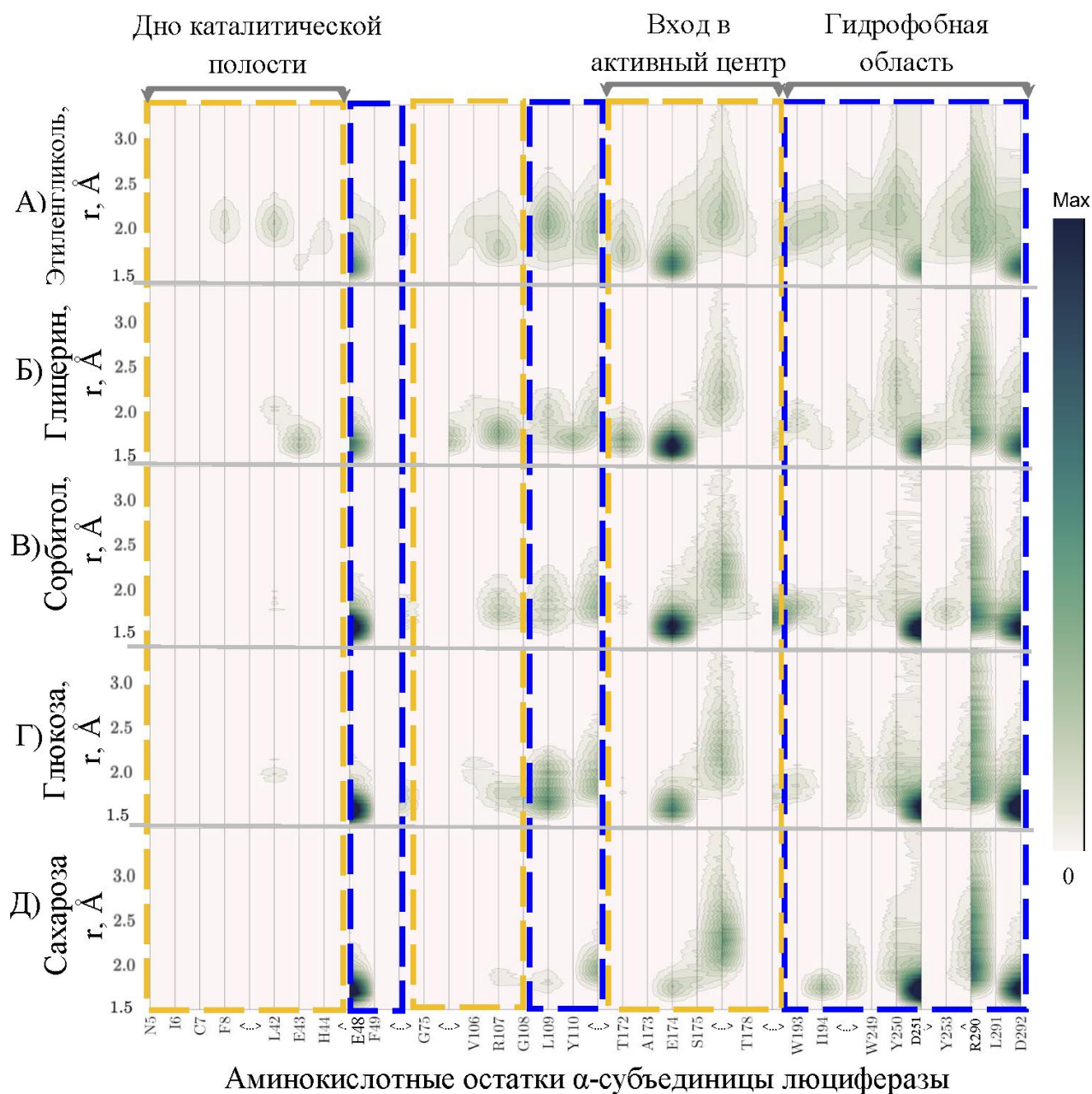


Рисунок 5 – Двухмерное представление g_{rc} относительно отдельных аминокислотных остатков α -субъединицы люциферазы *P. leiognathi* для осмолитов: (А) этиленгликоль, (Б) глицерин, (В) сорбитол, (Г) глюкоза, (Д) сахароза. Вдоль оси абсцисс указаны аминокислотные остатки, формирующие активный центр. Желтой рамкой выделены области связывания флавина, синей – альдегида. Рассчитано на основе МД-траекторий белка в окружении 40% осмолитов.

Это может объяснить экспериментально полученные результаты: в средах с сорбитолом, глюкозой и сахарозой для люциферазы *P. leiognathi* снижалась константа ассоциации альдегида [14]. В то же время, в растворах с этиленгликолем связывание с альдегидом наоборот усиливалось. Возможно, это объясняется тем, что относительно большие молекулы осмолитов имеют гидрофобные области, способные взаимодействовать с сайтом связывания альдегида, в отличие от негибких маленьких молекул этиленгликоля и глицерина. Если рассматривать области активного центра, не спрятанные глубоко в глобуле фермента, то можно заметить, что наибольшая вероятность присутствия осмолитов наблюдается около заряженных аминокислотных остатков – аспарагиновой и глутаминовой кислот (например, E48, E174, D251 и D292 на Рисунке 5). Эти аминокислотные остатки известны как элементы связывающих центров белков, и, вероятно, в исследованных нами системах они склонны связывать осмолиты.

Подвижность аминокислотных остатков люцифераз в присутствии осмолитов была оценена по параметру среднеквадратичной флуктуации (RMSF) C_{α} -атомов [30]. Проводили расчет ΔRMSF – разности значений в присутствии осмолита ($\text{RMSF}_{\text{осмолит}}$) и в его отсутствие ($\text{RMSF}_{\text{вода}}$). Установлено, что для большинства аминокислотных остатков α -субъединиц обеих люцифераз параметр ΔRMSF близок к нулю, то есть осмолиты не оказали влияния на подвижность цепи (Рисунок 6).

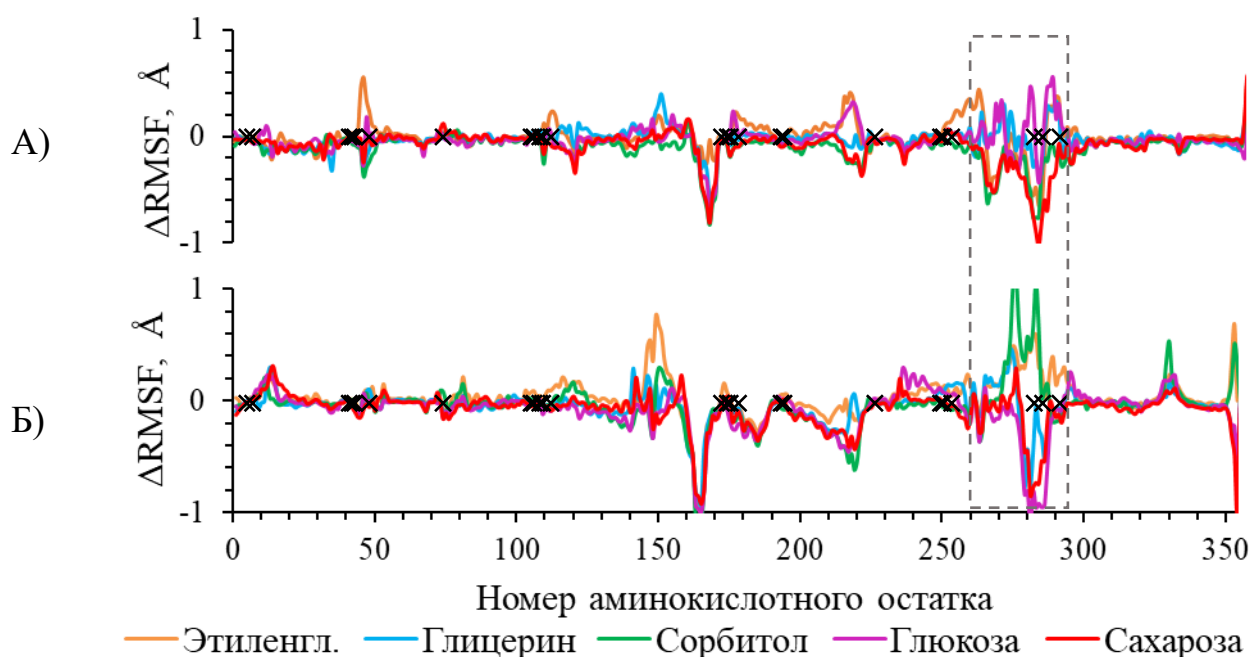


Рисунок 6 – ΔRMSF для C_{α} -атомов α -субъединицы люцифераз *V. harveyi* (А) и *P. leiognathi* (Б) в присутствии осмолитов (40 вес.%) на последних 20 нс МД-траектории. Участок мобильной петли ($\alpha 262$ - $\alpha 291$) отмечен рамкой. Функционально важные аминокислотные остатки показаны маркерами (x).

Однако было получено, что в присутствии сахарозы уменьшается подвижность мобильной петли ферментов (участок $\alpha 262$ - $\alpha 291$), которая играет важную роль в катализе [26, 40]. Для люциферазы *P. leiognathi* эффект стабилизации мобильной петли сахарозой выражен ярче, и глюкоза и сорбитол оказывают аналогичный эффект. Параметр ΔRMSF люцифераз был также рассчитан при вариации концентрации глицерина и сахарозы. Получено, что мобильная петля обоих

ферментов с ростом концентрации сахарозы становится менее подвижной. Для люциферазы *P. leiognathi* концентрационный эффект более выражен, чем для фермента *V. harveyi*, наблюдается даже усиление подвижности петли при 5%-й концентрации сахарозы. Для большинства остальных аминокислотных остатков $\Delta RMSF$ близко к нулю [41].

Проникновение осмолитов в активный центр может изменять ориентацию боковых цепей функционально важных аминокислотных остатков, что, в свою очередь, может негативно сказываться на стабилизации субстратов ферментативной реакции. Для проверки такого механизма влияния осмолитов были проанализированы конформации (двухгранные углы χ_1 и χ_2 боковых цепей) функционально важных аминокислотных остатков люцифераз. Не было выявлено значительных изменений конформаций, ни в присутствии разных осмолитов, ни при вариации концентрации одного осмолита (глицерина и сахарозы).

Для модельных систем были рассчитаны энергии кулоновского и ван-дер-ваальсова взаимодействий в парах белок-белок (Бе-Бе), белок-вода (Бе-Во), белок-осмолит (Бе-Ос, Ос-Бе), вода-осмолит (Ос-Во), осмолит-осмолит (Ос-Ос) (Рисунок 7). Было получено, что основной вклад в энергию кулоновского взаимодействия белков вносят внутрибелковые взаимодействия. При этом осмолиты частично заменяют молекулы воды, взаимодействующие с ферментами, без существенного влияния на суммарную величину кулоновской энергии (Рисунок 7, А).

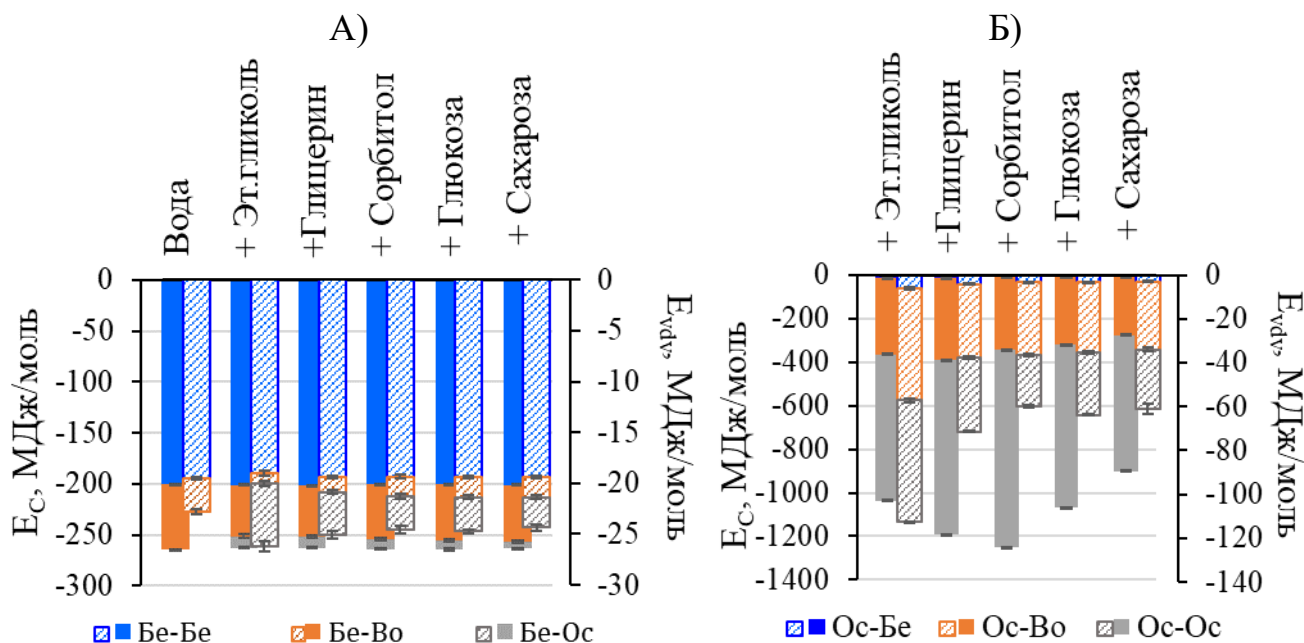


Рисунок 7 – Энергия невалентных кулоновских (E_C , заполненные столбики) и ван-дер-ваальсовых (E_{vdw} , заштрихованные столбики) взаимодействий между люциферазой *P. leiognathi* (Бе), осмолитами (Ос) и водой (Во) в модельных системах с 40%-м содержанием осмолитов: (А) для белка, (Б) для осмолита. Расчет для последних 20 нс молекулярной динамики.

В то же время, общая энергия ван-дер-ваальсова взаимодействия исследуемых систем несколько увеличивается в присутствии осмолитов за счет взаимодействия белок-осмолит. Для молекул осмолитов основной вклад в энергию невалентных взаимодействий вносит кулоновское взаимодействие в парах осмолит-вода и

осмолит-осмолит (Рисунок 7, Б).

Полученные изменения структурных характеристик люциферазы *P. leiognathi* в присутствии осмолитов были соотнесены с результатами исследования кинетики реакции, катализируемой этим ферментом, в средах с осмолитами [14]. Были посчитаны коэффициенты линейной корреляции r между экспериментальными функциональными параметрами и модельными структурными. Наиболее сильные корреляции ($|r| > 0,9$) оказались следующие:

- между показателем степени вязкостной зависимости константы связывания люциферазой восстановленного флавина, δ_{k1} , и количеством атомов осмолитов, попадающих в среднем в полость активного центра фермента за время молекулярной динамики (Рисунок 4, Г): $r = -0,98$;
- между каталитической константой фермента, k_{cat} , и энергией кулоновского взаимодействия между белком и осмолитом (Рисунок 7): $r = 0,92$; это согласуется с предположением о локализации молекул осмолитов около заряженных аминокислотных остатков в активном центре и у поверхности мобильной петли ферментов;
- между k_{cat} и энергией ван-дер-ваальсова взаимодействия молекул осмолитов с водой и друг другом (в расчете на одну молекулу осмолита): $r = 0,96$ и $0,99$ соответственно;
- между константой связывания альдегида, K_a , и энергией ван-дер-ваальсова взаимодействия между белком и осмолитом, а также между осмолитом и водой (Рисунок 7): $r = 0,93$ и $0,99$ соответственно; это может быть результатом гидрофобного характера связывания люциферазой данного субстрата.

Глава 4. Применение молекулярной динамики для исследования механизмов эффектов сред на ферментативные реакции

С помощью метода молекулярной динамики было исследовано влияние факторов температуры и присутствия осмолитов на структурно-динамические характеристики компонентов биoluminesцентной системы бактерий.

Была исследована структура люцифераз *V. harveyi* и *P. leiognathi* при температурах 5, 15, 27, 45 и 60 °C [42]. Установлено, что в условиях повышенной температуры укладка белковых глобул не изменилась в течение 100 нс моделирования, по сравнению с состоянием при нормальных условиях. Однако участок мобильной петли α -субъединиц обоих ферментов стал более подвижным при 60 °C (Рисунок 8, А, Б). Было получено, что присутствие 30%-й сахарозы стабилизирует этот сегмент структуры люцифераз, причем для *P. leiognathi* этот эффект выражен ярче (Рисунок 8, В, Г). Был сделан вывод, что увеличение амплитуды флуктуаций мобильной петли может быть механизмом термоинактивации бактериальной люциферазы, а снижение мобильности в присутствии сахарозы посредством взаимодействия осмолита с заряженными и полярными аминокислотными остатками – механизмом стабилизации структуры при высоких температурах, наблюдавшейся в экспериментальных исследованиях.

На основе MDFF были построены двухмерные карты частоты появления молекул сахарозы на расстоянии 1,5–3,5 Å от аминокислотных остатков мобильной петли (аналогично Рисунку 5). Определено, что атомы сахарозы чаще всего локализованы рядом с отрицательно заряженными боковыми цепями аспартата, на

расстоянии 1,5–2,0 Å, что соответствует первому гидратному слою белка. Плотность молекул сахарозы вблизи аминокислотных остатков петли люциферазы *P. leiognathi* выше, чем у гомолога, что может объяснять более заметную стабилизацию при высоких температурах.

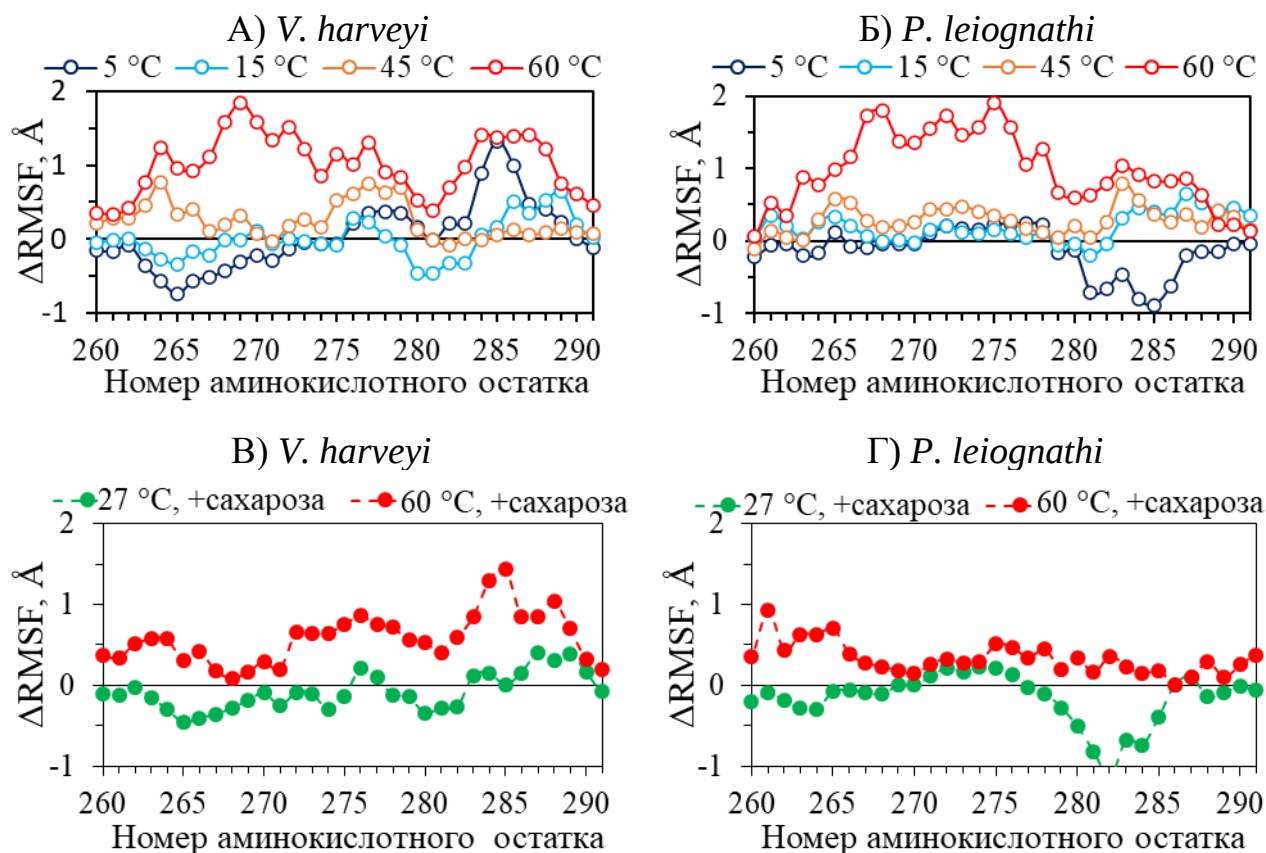


Рисунок 8 – ΔRMSF C_α -атомов мобильной петли люциферазы *V. harveyi* (А, В) и *P. leiognathi* (Б, Г) при разной температуре в окружении молекул воды (А, Б) и смеси воды с сахарозой (30%) (В, Г). $\Delta\text{RMSF} = \text{RMSF}_T - \text{RMSF}_{27^\circ\text{C}}$, где RMSF_T – параметр C_α -атома при температуре T , $\text{RMSF}_{27^\circ\text{C}}$ – параметр при 27 °C в воде.

Также было проведено молекулярное моделирование субстратов биolumинесцентной системы бактерий – FMN и NADH в водном окружении и присутствии 40% глицерина и сахарозы. Было получено, что молекулы осмолитов замещают молекулы воды в водородных связях с гетероатомами FMN и NADH. Атомы кислорода нуклеотидов, как правило, более доступны, чем атомы азота, для образования водородных связей с молекулами среды. Известно, что реакционная способность атома N5 флавина, участвующего в окислительно-восстановительных процессах в биolumинесцентных и других реакциях, повышается за счет взаимодействия воды с другими гетероатомами изоаллоксазинового кольца, кроме N3 [43]. В свою очередь, водородная связь с этим азотом снижает реакционную способность N5. Возможно, это и происходит для исследуемых систем, так как в присутствии глицерина и сахарозы количество водородных связей между водой и N3 уменьшается [44].

Также результаты молекулярного моделирования показали, что фосфатная группа обоих нуклеотидов вероятнее образует связь с молекулами глицерина, чем с сахарозой [44,45]. Известно, что фосфатная группа обоих нуклеотидов играет роль в

связывании нуклеотидов с белками, в том числе бактериальной люциферазой [26,46]. Таким образом, обнаруженные водородные связи глицерина с фосфатными группами нуклеотидов могут влиять на связывание субстратов с ферментами и, таким образом, на скорость катализа в целом.

Заключение

Раздел содержит выводы и обобщения на основе полученных результатов.

В диссертационной работе были исследованы структурно-динамические механизмы, определяющие влияние природных низкомолекулярных протекторных соединений – осмолитов (полиолов и сахаров) – на функциональные свойства двух бактериальных люцифераз. В работе впервые была получена трехмерная структура люциферазы *P. leiognathi* и проведен анализ ее структурных и динамических особенностей. На основе анализа корреляций структурных параметров ферментов, полученных с помощью метода молекулярного моделирования, и экспериментальных характеристик ферментативных реакций, установленных ранее, были сделаны выводы о механизмах влияния осмолитов на разные стадии биолюминесцентной реакции бактерий.

Полученные результаты позволили сделать следующие **выводы**:

1. Экспериментально наблюдаемые эффекты осмолитов (полиолов и сахаров) на реакцию, катализируемую бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, обеспечиваются сочетанием следующих молекулярных механизмов:

а) проникновение молекул осмолитов в активный центр фермента, зависящее от их размера,

б) локализация молекул осмолитов около заряженных и полярных аминокислотных остатков в составе центров связывания субстратов,

в) влияние на подвижность мобильной петли фермента, участвующей в стабилизации интермедиатов реакции.

2. Конформация боковых цепей каталитически важных аминокислотных остатков люцифераз не меняется в присутствии осмолитов (полиолов и сахаров), что говорит об отсутствии специфических локальных взаимодействий, влияющих на функцию фермента.

3. Предпочтительное связывание осмолитов (полиолов и сахаров) с поверхностью бактериальных люцифераз сопровождается увеличением объема активного центра фермента, что может оказывать влияние на стабильность интермедиатов реакции.

4. Характер взаимодействия глицерина и сахарозы с поверхностью бактериальной люциферазы зависит от концентрации осмолита, в результате чего может наблюдаться как эффект преимущественного связывания осмолита, так и преимущественной гидратации.

5. Люцифераза *V. harveyi* характеризуется более компактной упаковкой и меньшей мобильностью структуры, чем люцифераза *P. leiognathi*, что согласуется с различиями температурных эффектов на эти ферменты.

6. Люцифераза *V. harveyi* характеризуется большим объемом активного центра, чем люцифераза *P. leiognathi*, что может обуславливать различия в связывании субстратов и кинетике биолюминесцентной реакции.

7. Наблюдается взаимодействие глицерина с фосфатными группами FMN и NADH, что может влиять на скорость образования фермент-субстратных комплексов в биолуминесцентной системе бактерий.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, включенных в перечень ВАК:

1. Лисица А. Е. Вязкие среды замедляют распад ключевого интермедиата биолуминесцентной реакции бактерий / А. Е. Лисица, **Л. А. Суковатый**, В. А. Кратасюк, Е. В. Немцева // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2020. – Т. 492. – №. 1. – С. 320-324. (Lisitsa A. Viscous media slow down the decay of the key intermediate in bacterial bioluminescent reaction / A. Lisitsa, **L. Sukovaty**, V. Kratasyuk, E. Nemtseva // Doklady Biochemistry and Biophysics. – Pleiades Publishing, 2020. – Vol. 492. – I. 1. – P. 162-165.) Q3
2. **Суковатый Л. А.** Влияние осмолитов на биолуминесцентную реакцию бактерий: структурно-динамические аспекты / Л. А. Суковатый, А. Е. Лисица, В. А. Кратасюк, Е. В. Немцева // Биофизика. – 2020. – Т. 65. – №. 6. – С. 1135-1141. (**Sukovaty L. A.** The effect of osmolytes on the bioluminescent reaction of bacteria: structural and dynamic properties / L. A. Sukovaty, A. E. Lisitsa, V. A. Kratasyuk, E. V. Nemtseva, // Biophysics. – 2020. – Vol. 65. – I. 6. – P. 966-971.) Q4
3. Lisitsa A. Mechanisms of viscous media effects on elementary steps of bacterial bioluminescent reaction / A. Lisitsa, **L. Sukovaty**, S. Bartsev, A. Deeva, V. Kratasyuk, E. Nemtseva // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22. – I. 16. – P. 8827. Q1
4. Nemtseva E. V. Bacterial luciferases from *Vibrio harveyi* and *Photobacterium leiognathi* demonstrate different conformational stability as detected by time-resolved fluorescence spectroscopy / E. Nemtseva, D. Gulnov, M. Gerasimova, **L. Sukovaty**, L. Burakova, N. Karuzina, B. Melnik, V. Kratasyuk // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22. – I. 19. – N. 10449. Q1
5. Deeva A. Structure-function relationships in temperature effects on bacterial luciferases: nothing is perfect / A. Deeva, A. Lisitsa, **L. Sukovaty**, T. Melnik, V. Kratasyuk, E. Nemtseva // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – I. 15. – N. 8119. Q1
6. Gulnov D. Effect of viscous media on the photophysical characteristics of flavin mononucleotide / D. Gulnov, M. Gerasimova, **L. Sukovaty**, E. Nemtseva // Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics. – 2022. – Vol. 86. – I. 10. – P. 1196-1202. Q3
7. Lisitsa A. The role of cosolvent–water interactions in effects of the media on functionality of enzymes: a case study of *Photobacterium leiognathi* luciferase / A. Lisitsa, **L. Sukovaty**, A. Deeva, D. Gulnov, E. Esimbekova, E. Nemtseva, V. Kratasyuk // Life. – 2023. – Vol. 13. – I. 6. – N. 1384. Q2
8. Sutormin O. Coupling of NAD(P)H: FMN-oxidoreductase and luciferase from luminous bacteria in a viscous medium: Finding the weakest link in the chain / O. Sutormin, E. Nemtseva, D. Gulnov, **L. Sukovaty**, Y. Tyrtyschnaya, A. Lisitsa, V. Kratasyuk // Photochemistry and Photobiology. – 2023. Q2

Тезисы в сборниках материалов конференций:

1. Суковатый Л. А. Механизмы влияния осмолитов на биolumинесцентную реакцию бактерий / Л. А. Суковатый, А. Е. Лисица // Ломоносов - 2021 : материалы Международного молодежного научного форума, Москва, 12-23 апреля 2021 года. - Москва: ООО "МАКС Пресс", 2021.
2. Суковатый Л. А. Роль специфических взаимодействий в эффекте вязких сред с глицерином и сахарозой на биolumинесцентную реакцию бактерий / Л. А. Суковатый, А. Е. Лисица, Е. В. Немцева // VI Съезд биофизиков России : сборник научных трудов, Сочи, 16-21 сентября 2019 года. Том 1. - Сочи: ООО Полиграфическое объединение "Плехановец", 2019. - С. 89-90.
3. Структурно-функциональные особенности бактериальных люцифераз / Е. В. Немцева, А. Е. Лисица, А. А. Деева, Л. А. Суковатый [и др.] // Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России, Сочи, 16-21 сентября 2019 года. Том 2. - Сочи: ООО Полиграфическое объединение "Плехановец", 2019. - С. 124.
4. Molecular modeling of osmolytes' effect on bacterial luciferase / L. A. Sukovaty, A. E. Lisitsa, A. A. Deeva [et al.] // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022): Abstracts the Thirteenth International Multiconference, Novosibirsk, 04-08 июля 2022 года. - Novosibirsk: Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 2022. - P. 329.
5. Structural features of bacterial luciferase related to temperature adaptation / A. A. Deeva, L. A. Sukovaty, A. E. Lisitsa, E. V. Nemtseva // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022): Abstracts the Thirteenth International Multiconference, Novosibirsk, 04-08 июля 2022 года. - Novosibirsk: Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 2022. - P. 281.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yancey et al. // Science. – 1982. – Vol. 217. – №. 4566. – P. 1214-1222.
2. Ruckenstein et al. // Advances in colloid and interface science. – 2006. – Vol. 123. – P. 97-103.
3. Фонин и др. // Биофизика. – 2016. – Т. 61. – №. 2. – С. 222-230.
4. Street et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 103. – №. 38. – P. 13997-14002.
5. Richards et al. // Advances in protein chemistry. – Academic Press. – 1998.
6. Rösgen et al. // Biophysical journal. – 2005. – Vol. 89. – №. 5. – P. 2988-2997.
7. Tah et al. // The Journal of Physical Chemistry B. – 2016. – Vol. 120. – №. 42. – P. 10969-10978.
8. Holthauzen et al. // Methods in Enzymology. – Academic Press. – 2011. – Vol. 492. – P. 61-125.
9. Yancey et al. // Journal of experimental biology. – 2005. – Vol. 208. – №. 15. – P. 2819-2830.
10. Jamal et al. // The FEBS journal. – 2009. – Vol. 276. – №. 20. – P. 6024-6032.
11. Esimbekova et al. // Toxicology in Vitro. – 2017. – Т. 45. – P. 128-133.
12. Li et al. // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2022. – P. 1-9.
13. Lisitsa et al. // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22. – №. 16. – P. 882.
14. Lisitsa et al. // Life. – 2023. – Vol. 13. – №. 6. – P. 1384.

15. Politi et al. // The journal of physical chemistry A. – 2009. – Vol. 113. – №. 26. – P. 7548-7555.
16. Gazi et al. // Acs Omega. – 2023. – Vol. 8. – №. 3. – P. 2832-2843.
17. Adamczak et al. // Biochemical Journal. – 2016. – Vol. 473. – №. 20. – P. 3705-3724.
18. Hishida et al. // The Journal of Physical Chemistry B. – 2022. – Vol. 126. – №. 13. – P. 2466-2475.
19. Bolen. // Protein structure, stability, and folding. – 2001. – P. 17-36.
20. Rösgen. // Methods in enzymology. – 2007. – Vol. 428. – P. 459-486.
21. Harries et al. // Methods in cell biology. – 2008. – Vol. 84. – P. 679-735.
22. Hochachka et al. // Oxford university press. — 2002.
23. Oren. // The prokaryotes. – 2006. – Vol. 3. – P. 263-282.
24. Fisher et al. // Biochemistry. – 1995. – Vol. 34. – №. 20. – P. 6581-6586.
25. Fisher et al. // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – Vol. 271. – №. 36. – P. 21956-21968.
26. Campbell et al. // Biochemistry. – 2009. – Vol. 48. – №. 26. – P. 6085-6094.
27. Tinikul et al. // Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology-Volume 3. – Springer, Cham, 2014. – P. 47–74.
28. Webb et al. // Current protocols in bioinformatics. – 2016. – Vol. 54. – №. 1. – P. 5.6.1-5.6.37.
29. Waterhouse et al. // Nucleic acids research. – 2018. – Vol. 46. – №. W1. – P. W296-W303.
30. Van Der Spoel et al. // Journal of computational chemistry. – 2005. – Vol. 26. – №. 16. – P. 1701-1718.
31. Vanommeslaeghe et al. // Journal of computational chemistry. – 2010. – Vol. 31. – №. 4. – P. 671-690.
32. Tian et al. // Nucleic acids research. – 2018. – Vol. 46. – №. W1. – P. W363-W367.
33. Martinez et al. // Journal of chemical theory and computation. – 2017. – Vol. 13. – №. 12. – P. 6358-6372.
34. Pettersen et al. // Journal of computational chemistry. – 2004. – Vol. 25. – №. 13. – P. 1605-1612.
35. **Nemtseva et al.** // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – №. 19. – P. 10449.
36. Vagenende et al. // Biochemistry. – 2009. – Vol. 48. – №. 46. – P. 11084-11096.
37. Vagenende // Biophysical journal. – 2012. – Vol. 103. – №. 6. – P. 1354-1362.
38. Miotto et al. // arXiv preprint arXiv:2305.05038. – 2023.
39. **Lisitsa et al.** // Doklady Biochemistry and Biophysics. – Pleiades Publishing, 2020. – Vol. 492. – №. 1. – P. 162-165.
40. Campbell et al. // Biophysical journal. – 2010. – Vol. 99. – №. 12. – P. 4012-4019.
41. **Sukovaty et al.** // Biophysics. – 2020. – Vol. 65. – №. 6. – P. 966-971.
42. **Deeva et al.** // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – №. 15. – P. 8119.
43. Nishimoto et al. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology. – 1978. – Vol. 526. – №. 1. – P. 34-41.
44. **Sutormin et al.** // Photochemistry and Photobiology. – 2023.
45. **Gulnov et al.** // Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics. – 2022. – Vol. 86. – №. 10. – P. 1196-1202.
46. Heikal et al. // Molecular microbiology. – 2014. – Vol. 91. – №. 5. – P. 950-964.