

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Сибирский федеральный университет»

На правах рукописи



Суковатый Лев Алексеевич

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

1.5.2. Биофизика

Научный руководитель:

Кандидат физико-математических наук, доцент

Немцева Е.В.

Красноярск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. Взаимодействие осмолитов с белками и применение методов молекулярного моделирования для его изучения (обзор литературы)	8
1.1 Роль осмолитов в живой клетке	8
1.2 Сольватационные эффекты, влияющие на структурно-функциональные характеристики белков	12
1.2.1 Изменение структурно-динамических характеристик белков в присутствии осмолитов	12
1.2.2 Организации молекул растворителя в первом гидратном слое белка	16
1.2.3 Взаимодействие осмолитов с функционально важными участками структуры ферментов	22
1.3 Компьютерное моделирование белков в явном растворителе для исследования сольватационных эффектов	29
1.3.1 Применение метода молекулярной динамики	29
1.3.2 Численное интегрирование уравнений движения	31
1.3.3 Силовые поля	33
1.3.4 Периодические граничные условия моделирования для системы частиц в боксе	35
1.3.5 Оценка структурных переходов белковой глобулы по параметрам RMSD, Rg, SASA	37
1.3.6 Организации молекул растворителя в первом гидратном слое белка. Функция MDDF	38
1.4 Структура и функция бактериальной люциферазы	42
1.4.1 Биолуминесцентная реакция с участием бактериальной люциферазы	42
1.4.2 Структурные особенности бактериальной люциферазы	44
Глава 2. Методы исследования	49
2.1 Подготовка трехмерных структур ферментов для расчета молекулярно-динамических траекторий	49

2.2 Подготовка модельных систем, включающих бактериальные люциферазы в присутствии разных осмолитов	50
2.3 Анализ молекулярно-динамических траекторий	54
2.4 Расчет молекулярной динамики субстратов биolumинесцентной системы бактерий в присутствии осмолитов	56
Глава 3. Структурно-динамические характеристики бактериальных люцифераз в присутствии осмолитов	57
3.1 Получение трехмерных структур бактериальных люцифераз	57
3.2 Структурные особенности бактериальных люцифераз <i>V. harveyi</i> и <i>P. leiognathi</i>	59
3.3 Структура бактериальных люцифераз в растворах с осмолитами	63
3.4 Распределение молекул воды и осмолитов около поверхности бактериальных люцифераз	68
3.5 Влияние осмолитов на активный центр бактериальных люцифераз	81
3.6 Взаимодействие осмолитов с функционально важными участками структуры бактериальных люцифераз	98
3.7 Влияние осмолитов на конформацию боковых цепей функционально важных аминокислотных остатков люциферазы	102
3.8 Энергии невалентных взаимодействий белков и осмолитов в моделируемых системах	106
3.9 Заключение к главе	109
Глава 4. Применение молекулярной динамики для исследования механизмов эффектов сред на ферментативные реакции	111
4.1 Механизмы температурных эффектов на бактериальные люциферазы	111
4.2 Взаимодействие осмолитов с субстратами биolumинесцентной системы бактерий	116
4.3 Заключение к главе	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	123
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	126

ВВЕДЕНИЕ

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 биолуминесцентную 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 *P. leiognathi* и *V. 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 биOLUMИнесцентных 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 биоллюминесцентных биотехнологий СФУ.

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

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, выводов. Полный объем работы – 141 страница текста с 52-мя рисунками и 14-ью таблицами. Список литературы содержит 173 наименования.

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

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

1.1 Роль осмолитов в живой клетке

Метаболические процессы внутри клетки происходят в определенном диапазоне температур и давления. *In vivo*, регуляторный контроль скорости этих процессов через вариацию таких переменных в клетке невозможен. Вместо этого внутриклеточная регуляция осуществляется через изменение концентраций или ковалентных модификаций биополимеров, лигандов, воды и других растворенных веществ, которые влияют на термодинамическую активность, как исходных компонентов биохимической реакции, так и конечных продуктов [1, 5].

Первоначально присутствие низкомолекулярных, как неорганических, так и органических, соединений не учитывалось в исследованиях *in vitro* и не принималось в расчет научных исследований. Однако позже было установлено, что эти вещества представляют собой большую часть внутриклеточной среды, в присутствии которых протекают все биохимические реакции живых систем. Пришло понимание, что многокомпонентный состав клеток не может быть случаен, он возник в результате строгого естественного отбора [1,19].

Известно, что эволюционным факторам подвержены прежде всего организмы, находящиеся в неблагоприятных условиях: таких как резкое изменение температуры, давления, pH и т. д. Такие колебания являются неотъемлемой частью жизненного цикла клетки и приводят к изменению ее объема за счет исключения, либо увеличения количества внутриклеточной воды. Это происходит из-за изменения концентрации осмотически активных веществ внутри и снаружи клетки, приводящего к появлению осмотического градиента. В свою очередь, этот градиент вызывает перемещение молекул воды сквозь клеточную мембрану, что приводит к набуханию или сжатию клетки. Такой эффект получил название осмотического стресса [3, 15]. Адаптация к высокой ионной силе внутри клетки, вероятно потребовала бы многочисленных аминокислотных замен в структуре клеточных белков различных классов. Кроме того, известна сильная зависимость эффектов солей от их концентрации [1]. Было бы трудно, если вообще возможно, сконструировать белок, который сохраняет оптимальные функциональные способности в широком диапазоне концентраций солей. Поэтому клетки регулируют внутреннее осмотическое давление преимущественно посредством накопления не-электролитов.

Для выравнивания гидростатического давления и поддержания своего внутреннего объема клетка регулирует количество органических низкомолекулярных соединений, называемых осмолитами, которые посредством осмоса приводят ее объем к нормальным

значениям [20]. По своей сути осмолиты – протекторы, которые аккумулирует и синтезирует клетка для противодействия внешним негативным условиям [21].

Но поддержание внутриклеточного объема – не единственная функция осмолитов. Многие из негативных факторов среды также могут вызвать денатурацию белков. Присутствие осмолитов повышает стабильность структуры ферментов, предотвращает их агрегацию, а также зачастую повышает их каталитическую активность [3].

Встречающиеся в природе органические осмолиты разделяют на три класса: 1) полиолы и сахара, 2) аминокислоты и 3) метиламины и мочевиной [2, 22]. Первая группа включает в себя глицерин, сорбитол, трегалозу, глюкозу, сахарозу и многие другие соединения. Аминокислоты и их производные, выполняющие функцию осмолитов, это глицин, таурин и глутаминовая кислота. Природные метиламины, обычно используемые в исследованиях: N-оксид триметиламина (ТМАО), глицин-бетаин, саркозин и глицерофосфорилхолин. Функция всех этих осмолитов *in vivo* варьирует от защиты клеточного содержимого органов (таких как мозг или почка) до защиты целых небольших организмов (бактерий в высоко соленой среде) [21].

Живые клетки аккумулируют до 100 мМ осмолитов, что является достаточно большой концентрацией. Но особенно высокое содержание таких соединений характерно для организмов, живущих в условиях постоянного осмотического стресса, то есть при высоком давлении или повышенной концентрации солей [22,23]. Несмотря на то, что для большого количества биохимических процессов присутствие таких неорганических соединений необходимо, резкий рост концентрации солей и ионов в клетке по сравнению с нормальными значениями часто приводит к нарушению протекания метаболических процессов. Например, KCl и NaCl могут негативно влиять на активность ферментов растений и животных, проживающих в разных ареалах обитания [1]. Соли также оказывают негативный эффект на скорость ферментативного катализа и константу Михаэлиса (K_m) ферментов. Это хорошо видно на примере фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы водоросли *Dunaliella viridis*. Было показано, что концентрации глицерина, вплоть до почти молярных, не влияют на ферментативный процесс, в отличие от воздействия KCl и NaCl. *D. viridis* накапливает такое количество осмолита при выращивании в насыщенном солевом растворе.

Полиолы, такие как глицерин и маннит и различные сахара, являются обычными клеточными осмолитами и встречаются во многих одноклеточных водорослях, в некоторых солеустойчивых растениях и многих насекомых, подвергающихся воздействию отрицательных температур. Считается, что полиолы помогают удерживать воду в клетке, оставаясь при этом совместимыми с макромолекулярной функцией. Аминокислоты и их

производные, выполняющие функцию осмолитов, чаще всего обнаруживают у солеустойчивых бактерий, в клетках морских беспозвоночных и миксин [3, 24].

Показано, что типичные осмолиты глицин, аланин, пролин, таурин и β -аланин не оказывают значительного ингибирующего или активирующего действия на ферментативный катализ. Например, K_m фосфоенолпирувата для реакции пируваткиназы краба *Pachygrapsus crassipes* существенно не изменяется при концентрациях пролина и глицина близких к 1 М. Концентрация этих аминокислот в несколько раз выше, чем отдельных свободных аминокислот, используемых для поддержания внутриклеточного осмотического равновесия (примерно 50-100 мМ). Многие солеустойчивые растения накапливают высокие концентрации пролина в качестве основного внутриклеточного осмолита [1]. Концентрация ТМАО в клетках глубоководных рыб достигает 300 мМ, а иногда и выше. Осмолит мочевины, широко используемый в исследованиях как денатурирующий агент, при малых концентрациях или в паре с другими веществами также оказывает стабилизирующее действие на структуру белка. Так, клетки печени австралийских пустынных мышей содержат до 5 М мочевины и 2,5 М нейтрализующих ее действие осмолитов.

Почти все организмы используют органические, а не неорганические растворенные вещества для защиты своих клеток от неблагоприятных условий. Исключение составляют только некоторые археи, использующие соединения соли в качестве осмопротекторов [22]. Однако стоит отметить, что соль используется многими организмами для быстрой реакции на осмотический шок [25]. Большинство из осмолитов также выполняют функцию криопротекции. Они защищают клетки растений и животных (например, лягушек) от повреждений при очень низких температурах [5, 26].

Иногда осмолиты также подразделяют на две группы, основываясь на их влиянии на стабильность белковой глобулы. Вещества первой группы обладают денатурирующими свойствами (например, мочевина, гуанидин хлорид и лизин). Вторая группа, иногда их называют осмопротекторами, наоборот повышает стабильность ферментов, помогая им сохранить нативную структуру при воздействии внешних негативных факторов. Такой защитной функцией обладают большинство осмолитов, основными из которых являются полиолы и сахара [27].

Полиолы и сахара часто используются для сохранения каталитической активности ферментов *in vitro*. Данный класс осмолитов добавляют в раствор для стабилизации структуры ферментов либо других макромолекул. В отличие от аминокислот и солей, полиолы и сахара представляют собой незаряженные молекулы. Поэтому считается, что они оказывают влияние на структурные характеристики ферментов преимущественно через изменения динамики его микроокружения, а не через прямое взаимодействие с белком [28, 29].

Защитная роль осмолитов *in vivo* делает их одним из часто используемых стабилизирующих агентов в фармакологии и в фундаментальных исследованиях при моделировании внутриклеточных условий протекания ферментативных реакций. Нативная структура белка обычно достаточно чувствительна к любым изменениям свойств окружающей среды. Считается, что присутствие природных осмолитов в реакционной смеси снижает флуктуацию структурных участков фермента и приводит к реорганизации молекул воды в гидратном слое белка [29, 30].

Тем не менее, осмолиты, принадлежащие к одному химическому классу, могут оказывать неодинаковое влияние на стабильность белка и/или на его функциональную активность. Либо наоборот, органические соединения разных классов могут оказывать схожий эффект на структурно-функциональные характеристики ферментов [3, 31].

В ряде работ продемонстрировано, что некоторые ферментативные реакции, которые невозможны в буферных растворах из-за кинетических или термодинамических ограничений, могут быть возможны в присутствии осмолитов [32, 33]. Так, белки часто проявляют более высокую ферментативную активность при высоких температурах в присутствии осмолитов, с повышением порога плавления по сравнению с буферным раствором. Более того, недавние исследования показывают, что полиолы, такие как инозитол, могут предотвращать агрегацию белков (амилоидогенез). Благодаря положительным эффектам осмолитов на структуру ферментов и их сладкому вкусу, они широко применяются в качестве консервантов и стабилизирующих агентов в фармакологической и пищевой промышленности. Еще одним примером использования осмолитов является определение стабильности и стадий разворачивания белков с помощью мочевины как денатурирующего агента [15].

Осмолиты также широко используются для моделирования внутриклеточных условий протекания ферментативных реакций. Внутри живых клеток биохимические процессы протекают в гетерогенном как по составу, так и по пространственной организации, микроокружении, которое оказывает существенное влияние на скорость и равновесие ферментативных реакций [34]. Повышенная вязкость окружения белков *in vivo*, помимо замедления диффузии субстратов и ферментов, может также вызывать изменения их структурно-динамических свойств, что может напрямую влиять на клеточный метаболизм. Известно, что кинетика ферментативных реакций играет важную роль в регуляции многих клеточных процессов. В частности, к ним относятся сложные процессы клеточного цикла и транслокация белков через биомембраны в соответствующие органеллы [35, 36]. Таким образом, структура белка является результатом баланса между внутримолекулярными взаимодействиями функциональных групп белка и их взаимодействием с окружающим растворителем [37]. Следовательно, кинетику биохимических реакций предпочтительнее изучать в

хорошо охарактеризованных средах, имитирующих один или нескольких параметров внутриклеточного окружения. Данный подход призван заполнить пробел между традиционными исследованиями ферментов в буферных растворах и попытками анализа реакций в интактных клетках [1, 36, 38].

Исследование ферментативного катализа в водно-органических средах позволило расширить представление о возможных механизмах влияния соразтворителей вообще и осмолитов в частности на функцию ферментов. Однако понимание этих механизмов ещё не завершено, и выбор подходящего типа соразтворителя и диапазона концентраций для конкретной ферментативной реакции представляет собой серьёзную, трудоёмкую задачу, поскольку он основан на большом объеме экспериментальных исследований [32, 35, 39]. Каждый конкретный осмолит может оказывать свое уникальное специфическое воздействие на белок. Присутствие органических соразтворителей в реакционной смеси может также привести к быстрой инактивации фермента за счет денатурации, изменения конформационной стабильности или ингибирования [40].

1.2 Сольватационные эффекты, влияющие на структурно-функциональные характеристики белков

1.2.1 Изменение структурно-динамических характеристик белков в присутствии осмолитов

Сольватационными эффектами называют изменения структурно-функциональных характеристиках белков, возникающие под действием окружающих молекул растворителя [41]. Судя по опубликованным данным, сольватационные эффекты осмолитов на ферменты могут быть как полезными по отношению к выполняемой функции, так и нежелательными, в зависимости от конкретного случая и условий эксперимента. Выбор реакционной среды (например, содержание и тип осмолита) будет влиять как на субстрат, так и на белок, и может оказать сильное влияние на исход реакций, катализируемых ферментами. Растворитель может вызывать конформационные изменения белка и субстрата ферментативной реакции, влиять на динамику их структуры, действуя как ингибитор. Эти факторы, а также и другие вместе создают сложную взаимосвязь, наблюдаемую между реакционной средой и результатом биохимического процесса [30, 42].

Известно, что белки представляют собой полипептидную цепочку, свернутую в компактную трехмерную структуру. Такие сложные системы обладают большим количеством возможных вариантов укладки. Термодинамическая стабильность белка напрямую зависит от набора его аминокислотных остатков в структуре. В свою очередь, общая конфигурация

белковой глобулы и локальная конформация структурных сегментов фермента определяется посредством стерических, ван-дер-ваальсовых, гидрофобных и электростатических взаимодействий белка с самим собой и со всеми компонентами раствора [43]. Присутствие осмолитов может повышать стабильность структуры белка, либо наоборот, как в случае с мочевиной, приводить к денатурации. В ходе реакции, важные для катализа структурные перестройки в ферменте могут как завершиться за несколько фемтосекунд, так и не закончиться за несколько микросекунд, что делает их по-разному чувствительными к взаимодействиям фермента со средой [3, 44].

Взаимодействия белок-сорастворитель обычно объясняют прямыми или косвенными механизмами [16, 45, 46]. В целом, химически гетерогенная природа белкового остова и боковых цепей аминокислот определяет соотношение количества водородных связей во внутрибелковых взаимодействиях и между белком и средой. Согласно механизму прямого взаимодействия, когда белки взаимодействуют с соразтворителями через водородные связи, считается, что водородные связи белок-сорастворитель конкурируют с внутрибелковыми водородными связями, ответственными за устойчивость элементов вторичной структуры белков. В зависимости от природы и силы таких конкурирующих водородных связей происходят конформационные изменения в структуре белка. При косвенном взаимодействии соразтворители изменяют гидратационные свойства белка, нарушая гидратный слой и/или высвобождая воду из белка.

Современные экспериментальные методы, такие как рентгеновская кристаллография, ядерный магнитный резонанс (ЯМР) и электронная криомикроскопия (крио-ЭМ), способны предоставить информацию как о трехмерной конфигурации биологических макромолекул, так и зафиксировать определенные этапы биохимической реакции [47, 48]. Быстрые гармонические колебания атомов, повороты боковых цепей, время жизни водородных связей отдельных аминокислотных остатков происходят в масштабах времени от фемто- до наносекунд. Более медленные процессы, такие как согласованные движения доменов структуры белка, денатурация и другие значительные конформационные изменения в белковой глобуле могут быть зарегистрированы во временном масштабе от микросекунды и более [49, 50]. Например, исследования с помощью ЯМР показали, что изменения в коллективных движениях при образовании комплекса фермента с лигандом не ограничиваются только активным центром. Также были зафиксированы изменения в динамике структурных участков по всей белковой глобуле, находящиеся не в прямом контакте с активным центром [51]. Таким образом, исследования показывают, что соотношение структура-функция белков обеспечивается их динамическими характеристиками, на которые, в свою очередь, влияют

молекулы среды, независимо от того, являются ли они для ферментов субстратом, растворителем или кофактором.

Учитывая защитную роль осмолитов для клеток в природе, первоначально предполагалось, что их присутствие в реакционной смеси не должно вызывать структурные перестройки глобулярных белков и влиять на их динамические характеристики. Результаты исследований, направленных на изучение изменений вторичной и третичной структуры ферментов в растворах осмолитов, в большинстве случаев подтверждают это положение (Таблица 1.1) [52]. Как можно заметить из данных таблицы 1.1, в присутствии рассмотренных осмолитов значительных изменений в структуре ферментов не зарегистрировано, т. е. они совместимы с конформацией нативного состояния. В некоторых случаях осмолиты, особенно метиламины, способны вызывать увеличение количества структурированных участков белков (например, у бромелаина, NTD, трипсина). ТМАО отличается разнообразным влиянием на ферменты [53, 54]. Сахариды также в подавляющем большинстве случаев не влияют на пространственную организацию ферментов, за исключением сахарозы [53]. В её присутствии для некоторых ферментов наблюдается рост упорядоченных сегментов глобулы [55, 56].

Нейтральность действия осмолитов на структуру белков впервые обсуждалась на основе результатов экспериментов, полученных с помощью метода гель-фильтрационной хроматографии [1]. Было обнаружено, что присутствие осмопротекторов может влиять на количество упорядоченных сегментов вторичной структуры ферментов. Дальнейшие исследования с использованием методов кругового дихроизма также продемонстрировали отсутствие изменений во вторичной и третичной структуре белков [57]. Предположения о нейтральности осмолитов по отношению к конформации белковой глобулы были подтверждены с помощью методов рентгеноструктурного анализа. Анализ рибонуклеазы (RNase-S), кристаллизованной совместно с ТМАО, не выявил какого-либо изменения нативной структуры фермента [59].

Первые результаты об изменении конформации белковой глобулы под действием осмолитов были получены в исследовании Брэдбери с соавторами [60]. Было показано, что глицерин, который широко применяется для стабилизации ферментов в биохимических реакциях и при хранении ферментов, вызывает увеличение компактности альдегиддегидрогеназы дрожжей.

Таблица 1.1 – Влияние осмолитов на структуру белковой глобулы некоторых ферментов [52]

№	Фермент	Осмолит	Влияние на структуру	
			Вторичную	Третичную
1	RNase-A	Сахароза	Рост	Компактизация
		Сорбитол, маннит, ксилит, рибит, ТМАО, саркозин, бетаин,	Изменений нет	Изменений нет
2	RNase-S	ТМАО, таурин, сорбитол, маннит, ксилит	Изменений нет	Изменений нет
3	Лизоцим	Глицерин, рибит, ксилит, ТМАО	Изменений нет	Изменений нет
4	Химотрипсин	ТМАО	Неопределенно	Компактизация
		Бетаин, саркозин	Увеличение содержания β -листов	Незначительное изменение
		Сахароза	Увеличение содержания β -листов	Незначительное изменение
5	Трипсин	ТМАО	Неопределенно	Компактизация
6	Бромелаин	ТМАО	Увеличение содержания β -листов	Снижение компактности
7	Андрогеновый рецептор - NTD	ТМАО	Увеличение содержания α -спиралей	Изменений нет
8	Цитохром с	Сахароза	Увеличение содержания α -спиралей	Изменений нет

Также обнаружено, что метиламины повышают компактность глобулы некоторых белков, но также иногда вызывают хорошо регистрируемое уплотнение структуры в нативном состоянии. Например, присутствие ТМАО приводит к значительному смещению в синюю область спектра флуоресценции трипсина. Это является признаком того, что флуорофоры в структуре белка (триптофановые остатки) перемещаются из полярного окружения в более гидрофобную область, то есть вглубь глобулы [55]. Исследования с использованием метода кругового дихроизма, также демонстрируют увеличение количества β -листов у химотрипсина в присутствии метиламинов [61].

Молекулярное моделирование белков в окружении воды и осмолитов выявляет изменение динамики белковой глобулы. В работах [62, 63] был проведен расчет молекулярной динамики (МД) белков в присутствии глицерина. Показано, что с ростом концентрации осмолита подвижность аминокислотных остатков исследованных белков снижается, а компактность белковой глобулы увеличивается по сравнению с динамикой в водном окружении. А при моделировании белка в 100%-м глицерине конформация глобулы за время МД практически не отличалась от изначального состояния в кристалле. Стоит отметить, что в этих двух работах рассматривались не часто используемые модельные белки, представленные в таблице 1.1, а белки позднего эмбриогенеза (LEA-белки) и липазы *Bacillus subtilis* A, целлобиогидролазы I *Trichoderma reesei* и эндоглюканазы *Penicillium Verruculosum*.

Есть примеры, когда для осмолитов регистрируется эффект малых концентраций на динамику фермента. Лущекина с соавторами с помощью молекулярной динамики и различных структурных методов показали, что две концентрации сахарозы, 5 и 10%, приводят к разному изменению динамики как всей белковой глобулы ацетилхолинэстеразы, так и функционально важных сегментов структуры этого фермента [64].

На практике, исследования влияния осмолитов, как *in vitro*, так и *in silico*, проводятся для концентраций, не превышающих 30-60% [29, 65]. Для таких концентраций сахарозы, мальтозы и трегалозы Лербрет с соавторами изучали влияние на динамику белка на примере лизоцима [66]. Результаты молекулярно-динамических расчётов показали, что даже в присутствии 60 об.% сахаров компактность белковой глобулы лишь незначительно ниже, чем просто в воде. Авторы предполагают, что один из механизмов стабилизации фермента сахарами заключается не в уменьшении возможных конформаций белка, а в недопущении разрушения его нативного состояния под действием денатурирующих факторов (температура, pH и др.).

1.2.2 Организации молекул растворителя в первом гидратном слое белка

Известно, что вода является неотъемлемым участником метаболизма живых организмов и оказывает сильное воздействие на структурно-функциональные характеристики ферментов. Находясь в непосредственной близости от его поверхности, молекулы воды играют важную роль в процессах сворачивания/разворачивания структуры белка, молекулярного распознавания, связывания или высвобождения лигандов и, в целом, в каталитической активности [51]. В большом количестве экспериментальных и теоретических работ показано, что белок в своей сольватной оболочке реорганизует молекулы и воды, и других

низкомолекулярных компонентов среды, по сравнению с их состоянием в его отсутствие [67–69].

По типу взаимодействия с белком молекулы воды в растворе относят к одной из трех групп: (i) объемный растворитель, (ii) гидратный слой и (iii) связанная вода [68, 70]. К объемному растворителю относят молекулы окружения белка, находящиеся достаточно далеко от белка. На практике это такое расстояние, на котором присутствие макромолекулы пренебрежимо мало влияет на распределение молекул воды и/или соразтворителя.

Гидратный слой тесно взаимодействует как с поверхностью белка, так и с объемным растворителем. Он находится вблизи поверхности белка, взаимодействуя с боковыми цепями аминокислотных остатков, экспонированных в растворитель. В этой области электростатические свойства поверхности макромолекулы сильнее всего оказывают влияние на организацию и динамику молекул окружающего раствора. Молекулы воды в этом слое образуют сеть водородных связей с белком и между собой, что оказывает значительное влияние на структуру, динамику и функцию белка [29, 67].

Связанная вода была обнаружена при помощи методов рентгеноструктурного анализа и ЯМР при расшифровке белковых структур. Такие «упорядоченные» молекулы воды часто участвуют во внутренней гидратации белка и поддерживают множественные сильные водородные связи с аминокислотными остатками, лигандами и другими молекулами воды в/или вблизи сайтов связывания лигандов. Локальные кластеры воды в структуре белковой глобулы часто могут быть обнаружены в полостях и углублениях, недоступных для растворителей любой другой природы [71]. Часто связанная вода является консервативной среди родственных белков и способствуют структурной стабильности и пластичности фермента. Так Родригес-Альмасан с коллегами на примере триозофосфатизомеразы человека показали, что замена консервативной аминокислоты приводит к разрушению сети водородных связей между упорядоченной водой и белком, что снижает его каталитическую функцию [72]. Присутствие соразтворителей оказывает влияние на распределение молекул воды вблизи поверхности белка.

Организация и динамика гидратного слоя вокруг белка была изучена большим количеством теоретических и экспериментальных методов [51]. Такие исследования были важны и для объяснения молекулярного механизма защитного действия осмолитов на белковые макромолекулы. Одни из первых работ были посвящены изучению повышения стабильности белков в присутствии трегалозы. Этот осмолит считается наиболее эффективным биопротектором среди сахаров и полиолов. Было предложено несколько гипотез, объясняющих высокую эффективность, в основном базирующихся на свойствах трегалозы: высокой растворимости, низкой реакционной способности, хороших антиоксидантных

свойствах и т. д. Тем не менее, ни одна из предложенных характеристик не смогла объяснить рост стабильности структуры белка при неблагоприятных внешних условиях, поскольку такие свойства наблюдались только при ограниченном диапазоне температур и концентраций [73].

Существуют разные взгляды на механизмы стабилизирующего действия осмолитов на белки в растворе. Доминирующая точка зрения основана на модели преимущественного исключения соразтворителя с поверхности фермента. Это приводит к увеличению изменения свободной энергии Гиббса, связанной с денатурацией белка, что делает этот процесс термодинамически невыгодным [74]. Для оценки количества молекул компонентов смеси вода/соразтворитель вблизи поверхности белка используют коэффициент преимущественного взаимодействия (Γ). Его величину для молекул растворителя можно получить с помощью таких экспериментальных методов как денситометрия и осмометрия [29, 75]. Однако экспериментальные значения могут дать только усредненные по ансамблю значения коэффициента преимущественного исключения/связывания системы, не учитывая большой набор локальных конформаций белка. Методы молекулярной динамики позволяют описать организацию молекул окружения вблизи поверхности фермента на атомном уровне. Более подробно применение методов молекулярной динамики для расчета коэффициента Γ будет рассмотрено в разделе 2.3 [76].

Отрицательное значение Γ_{pc} и положительное значение Γ_{pw} говорят о том, что молекулы соразтворителя предпочтительно исключаются с поверхности белка и практически не присутствуют в первом гидратном слое белка (рис. 1.1, А). Считается, что подобная организация молекул окружения характерна прежде всего таких осмопротекторов как полиолы и сахара. Принято, что исключение таких низкомолекулярных осмопротекторов и является следствием их предпочтительного образования водородных связей с водой, чем с полипептидным остовом белка. Как следствие, наблюдается рост внутримолекулярных связей внутри полипептида, что способствует сохранению свернутого состояния структуры фермента [77].

Но существует также и другое объяснение преимущественного исключения осмопротекторов с поверхности белка: предполагается, что все осмолиты имеют больший размер, чем молекула воды и из-за стерических ограничений не могут полноценно связываться на поверхности белка [78]. Это стерическое исключение энтропийно неблагоприятно, что способствует более компактному нативному состоянию белковой глобулы [79].

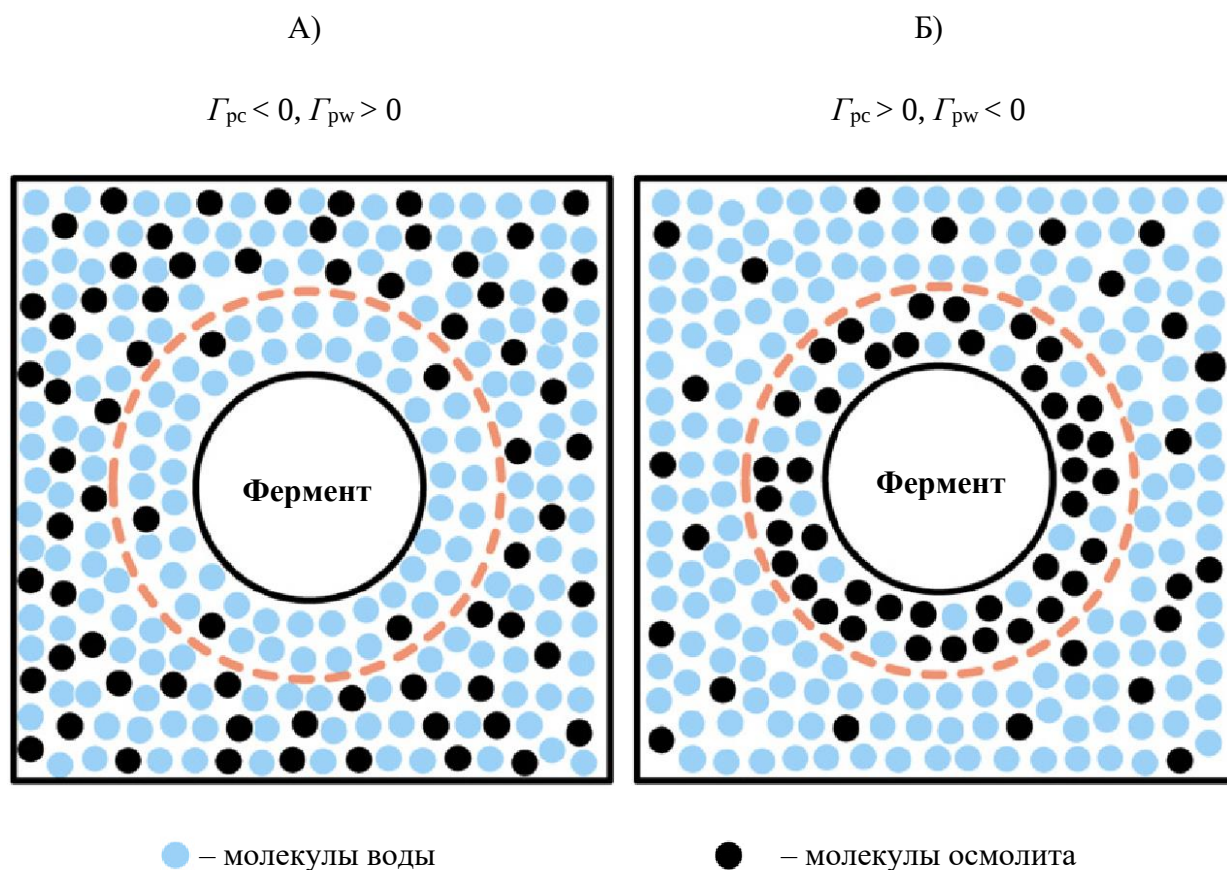


Рисунок – 1.1 Схематичное представление преимущественного исключения (А) и преимущественного связывания (Б) молекул осмолитов в гидратном слое белка (пунктирная красная линия). Адаптировано из [80].

Согласно теории преимущественного исключения, влияние денатурирующих осмолитов на структуру белка является следствием их более высокой аффинности к полипептидному остову, чем к воде и сопутствующего снижения внутримолекулярных водородных связей полипептида [77].

На рисунке 1.1, Б представлена обратная ситуация – с предпочтительным связыванием соразтворителя ($\Gamma_{pc} > 0$) и исключением молекул воды из первого гидратного слоя ($\Gamma_{pw} < 0$). Считается, что такой эффект дегидрирования белка наблюдается в присутствии денатурирующих агентов, самым известным из которых является мочеви́на. Было показано, что этот осмолит посредством диффузии может свободно подходить к поверхности фермента, разрушая внутримолекулярные водородные связи элементов вторичной структуры белка и одновременно образуя новые (фермент-мочевина). В свою очередь, это приводит к нарушению нативной конформации белковой глобулы [81].

Немаловажным фактом остается то, что большинство экспериментальных и теоретических исследований было проведено для относительно небольших белков, таких как лизоци́м, убиквитин и рибонуклеаза А, и преимущественно для водных растворов глицерина,

мочевины и ТМАО. Эти ферменты обладают небольшим размером и соответственно, простой, близкой к шарообразной, формой белковой глобулы. Для таких ферментов изменения в организации гидратного слоя в присутствии осмолитов хорошо согласуется с теорией предпочтительного исключения [28, 29, 66].

Стоит отметить, что стабилизация ферментов осмопротекторами посредством механизма их предпочтительного исключения не может быть строго распространена на абсолютно все белковые структуры. Большое количество экспериментальных и теоретических исследований показывает, что влияние осмолита на фермент в растворе может быть уникальным. Недавние исследования с использованием методов молекулярного моделирования подтвердило, что механизм стабилизации белковой глобулы более сложный, чем полное исключение молекул осмолитов из гидратного слоя [82, 83]. Взаимодействие белок-соразтворитель зависит как от условий проведения эксперимента (температура, pH, концентрация и т.д.) так и от специфичных взаимодействий между определённым осмолитом и ферментом. Например, осмопротекторы трегалоза и сорбитол оказывают денатурирующий эффект на некоторые белки, и в тоже время малые концентрации мочевины стабилизируют структуру ферментов (Таблица 1.2) [3, 84].

В статье [85] авторами было показано, что в зависимости от концентрации, молекулы сорбитола могут как предпочтительно исключаться, так и предпочтительно связываться на поверхности рибонуклеазы А.

Полноатомное молекулярное моделирование белка в окружении водных растворов осмолитов также позволяет более точно описать организацию гидратного слоя фермента. В работе [65] был проведен расчет молекулярной динамики лизоцима, дигидрофолатредуктазы и рибонуклеазы А в присутствии различных концентраций глицерина. Показано, что для водных растворов с объемной долей глицерина <50% гидратный слой исследованных белков имеет примерно тот же состав, что и объемный растворитель, и аминокислотные остатки на поверхности глобулы находятся в прямом контакте с глицерином.

Белки большего размера обладают сложным рельефом поверхности, доступной для воды и соразтворителя. Молекулы окружения, кроме области активного центра, могут аккумулироваться в различных полостях и углублениях на поверхности белковой глобулы, не подчиняясь теории предпочтительного связывания/исключения. Также осмолиты могут постоянно взаимодействовать с боковыми цепями аминокислотных остатков, экспонированных в растворитель [65, 86, 87].

Таблица 1.2 – Стабилизирующее/дестабилизирующее действие некоторых осмолитов на структуру белков в бинарном растворе [84]

№	Осмолит	Фермент	Условия	Эффект на структуру
1	Мочевина	Цитохром с, поли(N-изопропилакриламид)	Низкая концентрация	Стабилизация
			Высокая концентрация	Дестабилизация
2	Глицин бетаин	Рибонуклеаза А	Низкая концентрация	Стабилизация
			Высокая концентрация	Дестабилизация
3	Трегалоза	Малатдегидрогеназа	Низкая концентрация	Стабилизация
			Высокая концентрация	Дестабилизация
4	Этиленгликоль	Цитохром с, β -лактоглобулин, миоглобин, α -химотрипсин	Низкая температура	Стабилизация
			Комнатная температура	Дестабилизация
5	Триметиламиноксид (ТМАО)	Лизозим, α -лактальбумин, Рибонуклеаза А	pH <5	Дестабилизация
			pH >5	Стабилизация
6	Глицин бетаин	Лизоцим, Рибонуклеаза А	pH 4-4,5	Дестабилизация
			pH 7	Стабилизация
7	Глицерин	Каталаза	Низкий pH	Дестабилизация
			Высокий pH	Стабилизация
8	Сорбитол	Рибонуклеаза А	pH 2	Дестабилизация
			pH 5,5	Стабилизация

Такой механизм находит подтверждение и для ТМАО. Этот осмолит известен своим стабилизирующим действием на структуру ферментов, кроме того, он нейтрализует денатурирующий эффект присутствия мочевины в реакционной смеси [3, 81]. В работах [82, 84]

для небольших пептидов было получено, что ТМАО находится в постоянном контакте с поверхностью, в то время как осмолиты глицин и бетаин подчиняются теории предпочтительного исключения.

Уникальность и высокая специфичность взаимодействий белок-осмолит подтверждается и в других современных исследованиях. С помощью молекулярно-динамических подходов на примере форматдегидрогеназы *Candida boidinii* было описано экспериментально наблюдаемое повышение термостабильности фермента в присутствии некоторых осмопротекторов. Показано, что при всех исследованных концентрациях осмолиты глицерин, бетаин и трегалоза аккумулируются на поверхности фермента, в то время как ТМАО исключается из гидратного слоя [87]. Предпочтительное связывание глицерина также было продемонстрировано для четырех ферментов: липазы A *Bacillus subtilis*, целлобиогидролазы I *Trichoderma reesei*, эндоглюканазы *Penicillium verruculosum* [63].

Все вышеприведённые примеры подтверждает то, что присутствие молекул осмолитов в реакционной смеси может оказывать уникальное влияние, которое зависит от индивидуальных особенностей структуры как фермента, так и соразтворителя. В свою очередь, эффект присутствия осмолитов может заключаться в изменении конформации белковой глобулы и сайт-специфическом взаимодействии с функционально важными участками структуры фермента.

1.2.3 Взаимодействие осмолитов с функционально важными участками структуры ферментов

Проникновение молекул соразтворителей в активный центр ферментов

Ферменты осуществляют свою каталитическую функцию посредством взаимодействий с нуклеиновыми кислотами, субстратами, молекулами воды, соразтворителя и т. д. Области связывания таких лигандов формируются прежде всего третичным и четвертичным уровнями организации структуры белка [88]. Интерфейсы взаимодействия с молекулами окружения представляют собой углубления в структуре фермента (карманы различного размера) или канавки в виде туннеля, который соединяет разные участки белковой глобулы. Локальная конформация и объём, сольватация, полярность и другие физико-химические свойства этих полостей определяются аминокислотными остатками, участвующими в их формировании. Все это позволяет аминокислотным остаткам ферментов формировать уникальное микроокружение лигандов, обеспечивающее субстратное узнавание и выполнение каталитической функции [89].

Активным центром белка называется структурная область фермента, где происходит связывание и превращение субстрата биохимической реакции в ее продукт. Стоит отметить, что каталитическая область не является жестко упорядоченным элементом белковой глобулы, с четко определенной организацией ее функционально важных частей. Активный центр фермента представляет собой динамичный участок структуры белка, который может изменять свой объем и динамику посредством конформационных перестроек аминокислотных остатков. Такая реорганизация позволяет создать оптимальные условия для связывания субстрата ферментативной реакции [88].

Молекулы воды играют важную роль в ферментативной активности и должны иметь возможность входить и выходить из активного центра белков. Связывание субстрата приводит к замещению воды в сайте связывания. После завершения процесса катализа продукт ферментативной реакции исключается, а молекулы воды посредством диффузии снова заполняют активный центр [90, 91].

Как было отмечено в предыдущих разделах, присутствие соразтворителей нарушает организацию молекул окружения вблизи белка. С одной стороны, использование осмолитов приближает лабораторные эксперименты к условиям *in vivo* и в целом повышает стабильность белковой глобулы. С другой, соразтворители могут проникать в активный центр фермента, тем самым негативно влияя на его каталитическую функцию. Молекулы осмолита могут взаимодействовать с сайтом связывания субстрата, что приводит к конкурентному ингибированию ферментативной реакции [92]. Посредством водородных связей осмолиты могут взаимодействовать с функционально важными аминокислотными остатками в активном центре. Такое специфичное влияние вызывает смену ориентации боковых цепей, что может приводить к каталитически неактивным конформациям аминокислотных остатков [93]. Такие механизмы были продемонстрированы для бутирилхолинэстеразы человека в растворе глицерина (30 об.%). С помощью методов молекулярной динамики было показано, что данный соразтворитель проникает в активный центр фермента, снижая количество молекул воды. Более того, глицерин образует водородную связь с боковой цепью гистидина, разворачивая его в каталитически менее подходящую конформацию. Аналогичные результаты были показаны в работе Ванг с соавторами [94]. Они отмечают, что, не смотря на экспериментально зафиксированное сохранение стабильности структуры, активность липазы *Bacillus subtilis* А снизилась на 50% при высоких концентрациях глицерина по сравнению с контролем. Такое негативное влияние также объясняется исключением воды из активного центра фермента и взаимодействием с функционально важными аминокислотными остатками.

Тем не менее, эффект присутствия сорастворителя может быть разным в зависимости от природы как фермента, так и осмолита. Массон с соавторами на примере бутирилхолинэстеразы человека показали, что сахароза, в отличие от глицерина, из-за стерических ограничений не имеет доступа к активному центру фермента [93]. Присутствие этого сахара никак не влияет на кинетику ферментативной реакции, но из-за своих размеров сахароза остается на входе в активный центр бутирилхолинэстеразы и выполняет роль полупроницаемой мембраны для молекул воды.

Такие исследования показывают, что осмопротекторы, кроме функции стабилизации, могут также оказывать специфическое влияние на функционально важные участки структуры белка. Современные методы молекулярного моделирования позволяют на атомном уровне описать реориентацию боковых цепей аминокислотных остатков для объяснение экспериментально наблюдаемого снижения эффективности ферментативной реакции.

Реорганизация боковых цепей аминокислотных остатков под действием осмолитов

Как известно, конфигурации аминокислотных остатков свернутой белковой глобулы не статичны, положение аминокислот и их пространственная конфигурация постоянно флуктуируют. Хотя основная цепь (остов) незначительно колеблется в диапазоне, допускаемом стерическими ограничениями, боковые цепи аминокислотных остатков могут более свободно изменять свою ориентацию в пространстве [95].

Боковые цепи (радикалы) аминокислотных остатков в активном центре фермента играют важную роль в связывании субстрата биохимической реакции. Радикалы включают в себя важные для катализа функциональные группы, которые могут взаимодействовать с лигандами, кофакторами или другими аминокислотными остатками в активном центре [96]. Они формируют необходимое локальное микроокружение, обеспечивающее эффективное взаимодействие с субстратом. Для достижения оптимальной геометрии сайта связывания боковые цепи функциональных аминокислотных остатков должны иметь возможность изменить свою конформацию на более благоприятную для ферментативной активности [97]. Расшифровка трехмерных структур белков показала, что радикал одного и того же аминокислотного остатка может принимать несколько конформаций, и не все они являются каталитически активными. Хорошим примером является фермент альдегид дегидрогеназа (АлДГ). Было проведено сравнение высоко гомологичных АлДГ, выделенных из девяти различных организмов. Анализ кристаллических структур проводили в комплексе с субстратами/кофакторами и в отсутствии оных. Было показано, что Cys302 и Glu268 имеют несколько каталитически активных ориентаций боковых цепей, для которых конформационный переход совершается в зависимости от текущего этапа биохимической реакции [96].

Ориентация радикалов в белках описывается в терминах двугранных углов с использованием биохимической номенклатуры IUPAC-IUB [98]. Первый угол поворота, χ_1 , описывает вращение вокруг связи $C_\alpha-C_\beta$, в то время как χ_2 – вокруг связи $C_\beta-C_\gamma$, и так далее, в зависимости от размера радикала.

Анализ большого количества расшифрованных трехмерных структур белков показал, что радикалы аминокислотных остатков имеют ограниченное количество возможных конформаций в свернутой полипептидной цепи. Распределение значений двугранных углов χ боковых цепей достаточно точно поддавалось кластеризации. Это позволило выделить группы ротамеров – локальные энергетические минимумы конформаций боковых цепей аминокислотных остатков. Было установлено, что присутствие осмолитов может вызывать поворот радикала в менее оптимальную конформацию, что позволяет точно зафиксировать специфическое влияние сорастворителя [99, 100].

Осмолиты, проникая в активный центр, могут связываться с боковыми цепями аминокислотных остатков, вызывая их конформационную перестройку. Это, в свою очередь, может привести к изменению электростатических взаимодействий, гидрофобным эффектам и нарушению водородных связей, что в итоге приводит к ингибированию ферментативной реакции [93]. Было установлено, что молекулы глицерина вызывают реориентацию каталитически важных аминокислотных остатков бутирилхолинэстеразы человека и посредством такого механизма снижают её каталитическую активность.

Кроме того, молекулы осмолитов могут выступать как аллостерические ингибиторы. Такой механизм предполагает связывание сорастворителей вне активного центра, но на достаточном расстоянии для изменения динамики области активного центра. Это может создать новые либо убрать существовавшие стерические ограничения для конформационных переходов боковых цепей функционально важных аминокислотных остатков. Такая перестройка зачастую приводит к уменьшению скорости реакции и снижению активности фермента, что было показано для синтазы *Salmonella typhimurium* [92, 101].

1.2.4 Изменение кинетики ферментативной реакции в присутствии осмолитов

Несмотря на то, что осмолиты являются природными внутриклеточными веществами, нельзя однозначно предсказать, как именно они будут влиять на конкретную ферментативную реакцию. Снижение каталитической активности фермента при денатурации связано с разрушением конформации его активного центра. Предполагалось, что, поскольку осмопротекторы в нормальных условиях значительно не влияют на свободную энергию

Гиббса белковой глобулы, то можно ожидать, что их присутствие в реакционной смеси не должно существенно изменять активность ферментов [52].

Было проведено много исследований с целью понять, как присутствие осмолитов влияет на кинетические параметры ферментативных реакций, такие как каталитическая константа (k_{cat}) и константа Михаэлиса (K_m). Результаты для некоторых модельных белков представлены в таблице 1.3.

Таблица 1.3 – Влияние осмолитов разных классов на кинетические параметры ферментативных реакций, при физиологических pH [52]

№	Фермент	Осмолит	Параметр*	
			k_{cat}	K_m
1	RNase-A	Глюкоза, сахароза, галактоза, фруктоза, раффиноза	Снижение	Снижение
		Сорбитол, глицерин, ксилит, рибит, маннит	Изменения нет	Изменения нет
		Саркозин, бетаин, TMAO	Увеличение	Снижение
2	Лизоцим	Сорбитол, глицерин, ксилит, маннит	Изменения нет	Изменения нет
		TMAO, бетаин	—	Снижение
3	Альдозоредуктаза	Инозитол, сорбитол	—	Снижение
		Саркозин, бетаин, TMAO	Увеличение	—
4	А-химо-трипсин	Саркозин, бетаин, TMAO, сахароза	Изменения нет	Изменения нет
5	Трипсин	TMAO	—	Увеличение
		Глицерин		Снижение

* «—» означает отсутствие данных

Видно, что в большинстве случаев влияние осмолитов на кинетику ферментативной реакции не было зафиксировано. Тем не менее, для RNase-A продемонстрировано, что присутствие различных сахаров снижает величину k_{cat} и K_m . С другой стороны, полиолы не оказывают влияние на общую активность ферментов RNase-A и лизоцима [10]. Сорбитол и инозитол (в случае альдозоредуктазы) и ксилит (в случае каталазы) повышают активность путем увеличения сродства фермента к субстрату [61, 102]. Влияния осмолитов

метиламинового класса на кинетические параметры реакций также неоднозначно. Например, ТМАО, бетаин и саркозин увеличивают каталитическую константу РНКазы-А и альдозоредуктазы, но подобно глицерину не оказывают существенного влияния на α -химотрипсин. Присутствие ТМАО сохраняет активности трипсина, практически не влияя на K_m [55]. Аминокислоты и их производные в большинстве исследований не оказывали существенного влияния на ферментативную активность РНКазы-А, α -химотрипсина, лизоцима и других ферментов. Однако было обнаружено несколько исключений. Например, таурин снижал K_m альдозоредуктазы, а пролин повышал удельную активность каталазы [103].

Исследования белков большего размера также подтверждают неоднозначность эффектов осмопротекторов разной природы. В работе [104] было изучено влияние осмолитов на кинетические параметры дрожжевой гексокиназы. Для приближения к внутриклеточным условиям эксперимент проводили в условия макромолекулярного краудинга, моделируемого с помощью бычьего сывороточного альбумина (БСА). В качестве осмолитов были выбраны глицерин, бетаин и ТМАО. Показано, что все три осмолита лишь незначительно влияют на кинетические параметры ферментативной реакции. При добавлении данных осмолитов максимальная скорость реакции (V_{max}) и константа Михаэлиса были близки к значениям в буфере и в присутствии БСА (200-250 мг/мл). Это исследование подтвердило предположение о том, что органические осмолиты глицерин, бетаин и ТМАО обычно совместимы с функцией ферментов.

Активность пиразинамидазы *Mycobacterium tuberculosis* также не изменялась в присутствии сорбитола и сахарозы (20 %) по сравнению с буфером [56]. Однако ряд исследований показал, что каталитическая константа фермента может зависеть не только от природы осмолита, но и от его количества. Например, было получено, что при вариации концентрации глицерина в диапазоне 0-63 вес.% K_m лактатдегидрогеназы *Dunaliella salina* уменьшается более чем в два раза по сравнению с буфером, а V_{max} снижается до 30% от начального значения. [105]. При этом для целлюлозгидролазы I *T. reesei* было обнаружено, что активность фермента выше в растворах глицерина с концентрацией 10-30 об.%, чем в растворах с меньшей и большей концентрацией. Для двух других ферментов ситуация также неидентичная. Относительная активность липазы *A. B. subtilis* снижается с ростом концентрации глицерина, в то время как эндоглюканаза *P. verruculosum* оказалась практически не чувствительна к присутствию осмолита.

Подробно вопрос о влиянии низкомолекулярных органических веществ на кинетику ферментативной реакции был рассмотрен Чорпой с соавторами [106]. В своей работе авторы изучали роль воды в каталитической активности ферментов фолатного пути. Целью исследования было понять, насколько активно участвуют молекулы воды в процессе

связывания или в катализе. Для изменения состояния молекул воды в первом гидратном слое были использованы осмолиты глицерин, этиленгликоль, ТМАО, глицин бетаин и сахара. Исследования проводили на примере дигидрофолатредуктазы (R67 DHFR), которая является основным ферментом пути биосинтеза фолиевой кислоты. Этот белок катализирует восстановление дигидрофолата (DHF) до тетрагидрофолата с использованием NADH в качестве кофактора. Было показано, что с ростом концентрации всех выбранных осмолитов происходит снижение эффективности связывания фермента с DHF. Но для NADH такого влияния не наблюдалось. Одним из возможных механизмов влияния осмолитов на связывание R67 DHFR своего субстрата является предпочтительное взаимодействие осмолитов с ферментом и изменение его структурно-динамических свойств. Симметричные домены R67 DHFR формируют область активного центра, позволяющую в равной степени связывать как лиганд, так и кофактор. Таким образом, один и тот же сайт может быть занят либо лигандом, либо кофактором, которые связываются на противоположных сторонах симметричных сегментов активного центра. Следовательно, если бы осмолиты предпочтительно взаимодействовали с каталитическим сайтом, то снижение эффективности связывания должно было бы наблюдаться как для NADH, так и для DHF. Однако соразтворители оказывают разное влияние на связывание субстрата и кофактора с R67 DHFR. Таким образом, авторы сделали предположение, что наблюдаемые эффекты снижения скорости реакции для дигидрофолата обусловлены не взаимодействием осмолитов с ферментом, а взаимодействием с субстратом. Поскольку осмолиты связываются с DHF и препятствуют его ассоциации с R67 DHFR, было предположено, что аналогичный механизм должен сохраняться и для других ферментов, использующих в качестве субстрата дигидрофолат. Фермент EcDHFR имеет иную структуру и последовательность, чем R67 DHFR, но катализирует сходную реакцию. Исследования связывания DHF с EcDHFR показали снижение аффинности в присутствии осмолитов. Аналогичные результаты были получены и для птеридин редуктазы. Эти результаты подтвердили предположение о том, что осмолиты предпочтительно взаимодействуют с дигидрофолатом, а не с ферментом. Было показано, что осмолиты конкурируют с молекулами воды и вытесняют их из гидратного слоя субстрата. Поэтому при образовании комплекса с белком требуется больше энергии для исключения молекул осмолита, чем молекул воды. Это приводит к снижению аффинности и к смещению равновесия реакции связывания в сторону образования свободного фермента и дигидрофолата.

В целом, анализ публикаций показывает, что возможны разные виды взаимодействий в системе фермент-субстрат-осмолит, поэтому характер влияния осмолитов на биохимические процессы может быть обусловлен большим количеством возможных

механизмов и факторов. Современные методы теоретического моделирования позволяют на атомном уровне описать эффекты присутствия соразтворителя на структуру и, как следствие, функцию белков.

1.3 Компьютерное моделирование белков в явном растворителе для исследования сольватационных эффектов

1.3.1 Применение метода молекулярной динамики

Экспериментальные исследования с использованием высокоточных приборов и методов не всегда могут помочь определить конкретные механизмы влияния соразтворителей на структуру белка. Изучение стадий ферментативных реакций и сопутствующих конформационных изменений белка осложняется тем, что некоторые структурные переходы в комплексе белок-лиганд невозможно экспериментально зафиксировать в силу либо скоротечности процесса, либо нестабильности структуры. Современные теоретические методы позволяют описать механизмы взаимодействия между биологическими макромолекулами и их окружением на атомном уровне.

Метод молекулярной динамики широко применяется для исследования эффектов растворителя на структуру белков. Работы в этой области последних десятилетий, объединенные с экспериментальными результатами, внесли весомый вклад в понимание механизмов взаимодействия между белком и окружением. Однако следует признать, что подавляющее большинство исследований было выполнено на относительно небольших белках (<8,5 кДа), что в основном было связано с отсутствием высокопроизводительных вычислительных мощностей [51, 107]. Это не позволяло в полной мере описывать движение миллионов атомов, окружающих белковую глобулу в многокомпонентных модельных смесях *in vitro*, и тем более внутри клеток, как и сложные связи между ними. Современное оборудование и эффективные алгоритмы расчета позволяют моделировать среды, более приближенные к реальным, для понимания механизмов ферментативного катализа в клетке [30, 32, 51].

На сегодняшний день метод молекулярного моделирования используется, чтобы охарактеризовать: (а) изменение общей структуры и динамики белка; и (б) сайт-специфических эффектов, которые влияют на ферментативный катализ. Исследования по направлению (а) включают анализ: (а₁) конформационных изменений, переходов и динамики белка, (а₂) химического состава поверхности белка, (а₃) белок-белковых взаимодействий, (а₄) аллостерической регуляции и т. п. В свою очередь, вычислительное моделирование локальных или сайт-специфических свойств белка (б) направлено на анализ: (б₁) конформации,

динамики активного центра, (б₂) связывания субстрата и высвобождения продукта, (б₃) транспорта субстрата, (б₄) связывания и высвобождение кофактора, и др. [51].

Молекулярная механика представляет собой моделирование молекулярных систем на основе простых функций потенциальной энергии, например, таких как потенциал Кулона. Этот подход широко применяется в различных методах компьютерного моделирования — молекулярной динамике (МД), квантово-механическом моделировании, расчёте энергии взаимодействия с лигандами и т. д. На сегодняшний день молекулярная динамика является одним из самых популярных подходов при изучении свойств различных структур, от белков и биополимеров до нанотрубок [108, 109]. Динамические события, которые могут влиять на функциональные свойства системы, можно непосредственно проследить на атомном уровне, что делает молекулярную динамику особенно ценным инструментом для молекулярной биологии.

Первоначально идея создания и разработки МД-метода появилась в 1950-х гг. В 1957 г. было проведено самое первое МД-моделирование с использованием модели твердой сферы, в которой атомы взаимодействовали только через совершенные столкновения. Понадобилось более двадцати лет, прежде чем развитие компьютерных технологий и теоретических подходов позволило в 1976 г. провести первое моделирование белка с использованием тех принципов, которые активно применяются сейчас. Первый расчет молекулярной динамики был проведен для аprotина (небольшой ингибитор трипсина крупного рогатого скота) с временем симуляции всего 9,2 пс, в системе было всего 500 атомов. Современные вычислительные технологии и новые теоретические подходы сделали рутинным вычисление МД для систем размером в десятки тысяч атомов со временем моделирования в сотни наносекунд, вплоть до 1 мкс и выше. Для белков различные динамические процессы имеют временные масштабы от фемтосекунд до часов. Присутствие сорастворителей, изменение внешних условий (температура, pH и т. д.) может влиять на быстрые локальные переходы в структуре белка, что, в свою очередь, может влиять на ферментативную активность. Но также существуют более медленные изменения в структуре, такие как денатурация, которые происходят в масштабе всего белка. Примеры характерных процессов и временных интервалов представлены в таблице 1.4 [109, 110].

Таблица 1.4 – Характерные временные интервалы изменений структуры белка

№	Процесс	Амплитуда, нм	Временной интервал, с
1	Колебания длины связей	0,0001 - 0,01	10^{-14} - 10^{-13}
2	Вращение боковых цепей, подверженных воздействию растворителя	0,5 - 1,0	10^{-11} - 10^{-10}
3	Относительное движение глобулярных доменов	0,1 - 0,5	10^{-11} - 10^{-7}
4	Вращение внутренних боковых цепей	0,5	10^{-4} - 1
5	Аллостерические переходы	0,1 - 0,5	10^{-5} - 1
6	Локальная денатурация	0,5 - 1	10^{-5} - 10^1
7	Движение петель	1 - 5,0	10^{-9} - 10^{-5}
8	Движение жестких элементов структуры (спиралей)	1 - 5,0	10^{-9} - 10^{-6}
9	Значительное перемещение спиралей	> 5,0	10^{-7} - 10^{-4}

1.3.2 Численное интегрирование уравнений движения

Метод молекулярной динамики подразумевает расчёт классических (ньютоновских) траекторий движения макромолекулы в фазовом пространстве координат и импульсов ее атомов. Классическая молекулярная динамика описывает взаимодействующую группу материальных точек, которая является образом реально существующего молекулярного объекта [111]. Движение частиц системы описывается с помощью классических уравнений Ньютона:

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = F_i \quad i = 1, \dots, N \quad (1.1)$$

где, r_i – радиус-вектор частицы, F_i — сила, действующая на i -ю частицу в момент времени t , m_i – ее масса, а N – общее количество частиц в системе. «Частицы» обычно являются атомами макромолекулы, но в тоже время могут представлять собой и отдельные обособленные структуры (химическая группа, макромолекула). Такое представление соответствует модели Борна-Оппенгеймера, согласно которой атомы это точечные массы, а их положение в пространстве фиксируется по координатам ядер атомов.

Для интегрирования дифференциальных уравнений второго порядка необходимо задать мгновенные силы, действующие на частицы, их начальные положения и скорости. Это позволяет описать эволюцию системы с течением времени, то есть изменение координат атомов за время моделирования. Ввиду многокомпонентной природы биологических макромолекул и их окружения, уравнения движения могут быть решены только численно. Все алгоритмы интегрирования предполагают, что положения, скорости и ускорения могут быть аппроксимированы с помощью ряда Тейлора:

$$r(t + dt) = r(t) + v(t)dt + \frac{1}{2}a(t)dt^2 + \dots \quad (1.2)$$

$$v(t + dt) = v(t) + a(t)dt + \frac{1}{2}b(t)dt^2 + \dots \quad (1.3)$$

$$a(t + dt) = v(t) + b(t)dt + \frac{1}{2}c(t)dt^2 + \dots \quad (1.4)$$

где r – положение, v – скорость (первая производная положения по времени), a – ускорение (вторая производная положения по времени). На практике, значений r , v и a обычно достаточно для описания временной эволюции системы. Остальные члены – производные третьего (d^3r/d^3t) и более высокого порядка – обычно не учитываются. Их сумма принимается равной нулю, а само разложение ряда обрывается на ускорении.

Большинство используемых на сегодняшний день алгоритмов численного интегрирования основано на методе конечных разностей. Временной отрезок разбивается на очень короткие интервалы dt . Алгоритм Верле (Verlet) является одним из самых популярных методов интегрирования. Расчет значений координат и ускорений происходит для частицы в момент времени t , а также для предыдущего шага моделирования ($t - dt$):

$$r(t + dt) = 2r(t) + r(t - dt) + \frac{d^2r(t)}{dt^2}(t)dt^2 + O(dt^4). \quad (1.5)$$

Недостаток этого алгоритма заключается в том, что с помощью него невозможно явно получить значения скоростей для атомов в системе. Это важно, так как положение (координаты, изменяющиеся во времени) каждой частицы в пространстве определяется $r_i(t)$, тогда как скорости $v_i(t)$ определяют кинетическую энергию и температуру в системе. Для расчета скоростей атомов в явном виде была разработана модификация алгоритма Верле – метод *leapfrog*. Алгоритм перескока/перешагивания применяется на полуинтервале $t + \frac{dt}{2}$, для которого происходит вычисление скорости и положение частицы:

$$r(t + dt) = r(t) + \frac{dr(t)}{dt} \left(t + \frac{dt}{2} \right) dt + O(dt^4) \quad (1.6)$$

$$d \frac{dx(t)}{dt} \left(t + \frac{dt}{2} \right) = \frac{dx(t)}{dt} \left(t - \frac{dt}{2} \right) dt + \frac{d^2x(t)}{dt^2} dt + O(dt^2) \quad (1.7)$$

Метод *leapfrog* получил свое название в связи с тем, что расчет скоростей происходит на полуинтервалах, в отличие от заданного интервала r_i . Преимущество метода Верле и его модификаций в том, что решение этих уравнений обратимо. То есть, при изменении знаков скоростей на противоположные, временная эволюция частиц системы пойдет в обратном направлении.

1.3.3 Силовые поля

Как было описано выше, метод молекулярной динамики предполагает описание положения частиц моделируемых систем как для материальной точки. В свою очередь, сами атомы представлены в виде сфер, а связи между ними – в виде пружин. При таком подходе, динамика частиц и их взаимодействия между собой могут быть описаны с помощью простых математических функций. В методе МД формулы и необходимые параметры системы задаются силовым полем [107, 109, 111].

Силовое поле описывает виды взаимодействий атомов в моделируемой системе, которые были получены на основе экспериментальных данных или на основе теоретических квантово-механических расчетов. Стандартное силовое поле включает в себя элементы, описывающие электростатические (кулоновские) взаимодействия между атомами, упругие взаимодействия, которые моделируют предпочтительную длину каждой ковалентной связи, и элементы, описывающие несколько других типов межатомных взаимодействий.

В методе МД полная потенциальная энергия всей системы описывается как сумма вкладов энергий каждого из типа взаимодействий:

$$U = U_{\text{валентных связей}} + U_{\text{валентных углов}} + U_{\text{торсионных углов}} + U_{\text{плоских групп}} + U_{VdW} + U_{qq}. \quad (1.8)$$

В свою очередь, каждый потенциал задается следующими функциями:

$$U_{\text{валентных связей}} = \sum_i K_{i,j} (l_i - l_0)^2, \quad (1.9)$$

$$U_{\text{валентных углов}} = \sum_i K_{\theta,i} (\theta_i - \theta_0)^2, \quad (1.10)$$

$$U_{\text{торсионных углов}} = \sum_i K_{\varphi,i} (1 \pm \cos (n_i \varphi_i), \quad (1.11)$$

$$U_{\text{плоских групп}} = \sum_i K_{\psi,i} (1 \pm \cos (2\psi_i), \quad (1.12)$$

где l_i – длинна валентной связи, θ_i – величина валентного угла, φ_i – величина валентного угла, ψ_i – величина двугранного угла, l_0 и θ_0 – равновесные валентные связи и углы, $K_{i,j}$, $K_{\theta,i}$, $K_{\varphi,i}$, $K_{\psi,i}$ – силовые константы соответствующих гармонических потенциалов, n_i – обозначает целые числа, отражающие симметрию соответствующих торсионных углов.

U_{VdW} – функция невалентных ван-дер-вальсовых взаимодействий между парами атомами, которая описывается в виде модифицированного потенциала Леннарда-Джонса:

$$U_{VdW} = \sum_{i < j} \sum_j 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] W_{VdW}(r_{ij}) \quad (1.13)$$

где ε_{ij} и σ_{ij} – параметры потенциала Леннарда-Джонса, r_{ij} – расстояниями между частицами i и j , $W_{VdW}(r_{ij})$ – функцию переключения, гладко сводящая потенциал в ноль на участке $[R_{on}, R_{off}]$.

$$W_{VdW}(r_{ij}) = \begin{cases} 1, & r_{ij} \geq R_{off} \\ \frac{(R_{off}^2 - r_{ij}^2)^2 * (R_{off}^2 - 3R_{on}^2 + 2r_{ij}^2)}{(R_{off}^2 - r_{ij}^2)^3}, & r_{ij} \leq R_{on} \\ 0, & R_{on} < r_{ij} < R_{off} \end{cases} \quad (1.14)$$

В свою очередь, кулоновская энергия взаимодействия между парой частиц характеризуется:

$$U_{qq} = \sum_{i < j} \sum_j \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}} W_{qq}(r_{ij}). \quad (1.15)$$

Здесь q_i и q_j – парциальные заряды пар атомов, r_{ij} – расстояниями между частицами i и j . W_{qq} – экранирующая функция с радиусом R_q , которая определяется следующим образом:

$$W_{qq}(r_{ij}) = \begin{cases} \left(1 - \frac{r_{ij}}{R_q} \right)^2, & r_{ij} < R_q, \\ 0, & r_{ij} \geq R_q. \end{cases} \quad (1.16)$$

Использование формул (1.13-1.16) предполагает наличие ненулевого вклада потенциалов, для ван-дер-ваальсовых взаимодействий на расстоянии для частиц $<R_{off}$, для кулоновских $<R_q$. На практике, такие радиусы отсечки позволяют сократить трудоемкость вычислений энергий взаимодействий между парами частиц в моделируемых системах.

На сегодняшний день существует множество силовых полей, самыми распространенными из которых являются AMBER [112], CHARMM [113], OPLS [114], GROMOS [115]. Каждое из них содержит необходимую информацию для описания типов моделируемых частиц и потенциалов их взаимодействия. Силовые поля по своей сути являются приближенными. Сравнение результатов моделирования с экспериментальными данными показывает, что силовые поля значительно улучшились за последнее десятилетие, но они все еще остаются несовершенными, и возможная неточность, вносимая этими приближениями, должна учитываться при анализе результатов моделирования. Значения парциальных зарядов, радиусы отсечки и т. д. могут варьироваться в зависимости от выбранного силового поля.

В качестве ограничений метода МД, стоит отметить, что в классическом моделировании ковалентные связи не образуются и не разрываются. Это делает невозможным применение молекулярной динамики для моделирования (био)химических реакций [107, 108].

1.3.4 Периодические граничные условия моделирования для системы частиц в боксе

Современная молекулярная динамика позволяет моделировать поведение достаточно больших систем, состоящих из макромолекул, например, белков, окруженных явным растворителем. Во время симуляции возможны конформационные перестройки отдельных областей белка и некоторое перемещение всей структуры в пространстве в целом, что может привести к выходу из области моделирования. Чтобы избежать этого, можно расширить рабочее пространство модели, что приведет к увеличению количества молекул, и следовательно, значительно увеличит время расчета. Однако, ранее было показано, что для моделирования термодинамических свойств системы можно использовать периодические граничные условия вместо рассмотрения макроскопической модели. Такой подход в настоящее время используется наиболее часто при моделировании молекулярной динамики [107, 111].

Периодические граничные условия позволяют рассматривать сравнительно небольшую область пространства – «бокс», в котором расположена изучаемая молекула. При этом модельный бокс окружен полностью идентичными отображениями – «периодическими образами» (Рисунок 1.2). Если во время симуляции атом, ион, молекула и т.д. выходит за

границы основного бокса, то с противоположной стороны в него входит точно такая же копия вышедшей частицы. В результате моделируется система атомов, заполняющих все пространство, но рассматриваются только атомы модельного бокса [109, 111].

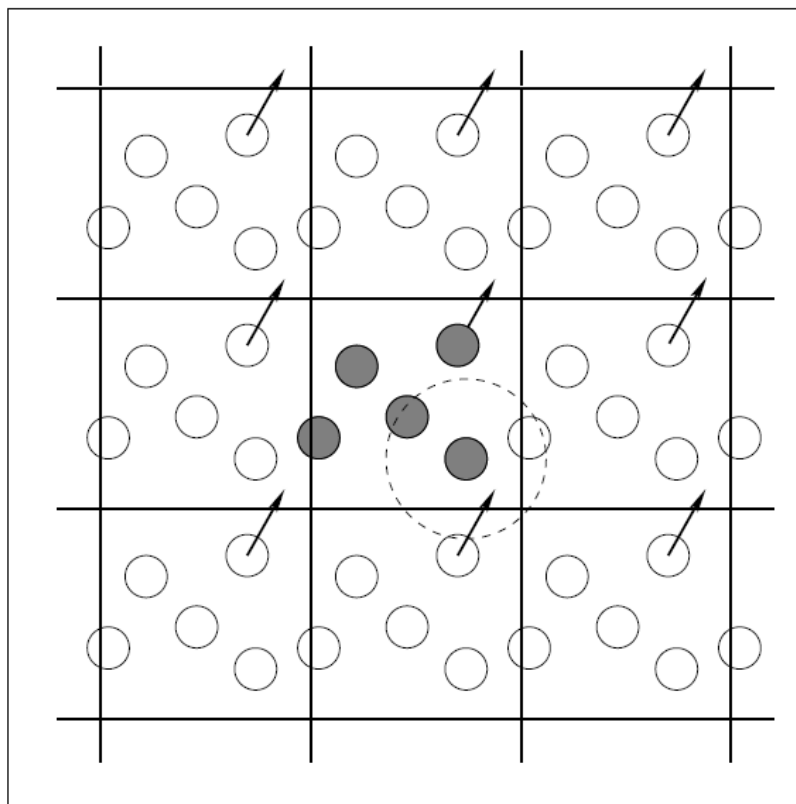


Рисунок 1.2 – Схематичное изображение периодических граничных условий на плоскости. Моделируемая система расположена в центре. Частицы, формирующие периодический образ, могут взаимодействовать с атомами реальной системы и наоборот. Адаптировано из [116].

Когда молекула белка помещается в бокс с условием периодической границы, минимальное расстояние от крайнего атома фермента до границы бокса должно быть $>1,0$ нм. Данное ограничение вводится для того, чтобы удовлетворить условие минимального образа. Это означает, что белок никогда не должен взаимодействовать со своим периодическим образом, иначе рассчитанные силы будут ложными. Таким образом, при расстоянии в $1,0$ нм до границы бокса дистанция между белком и его периодическим изображением составит $2,0$ нм. Это расстояние в большинстве случаев является достаточным для исследуемых систем [27–28].

1.3.5 Оценка структурных переходов белковой глобулы по параметрам RMSD, Rg, SASA

Среднеквадратичное отклонение атомов (RMSD)

Одним из самых распространенных методов оценки изменения конформации белковой макромолекулы является расчет среднеквадратичного отклонения атомов (*root-mean-square-deviation* – RMSD). Данный параметр используется при анализе траекторий молекулярной динамики, чтобы установить время релаксации системы и определить такие значительные конформационные изменения структуры белка, как фолдинг или денатурация. Расчет RMSD происходит между положением (координатой) C_{α} -атома аминокислотного остатка в структуре в начале расчетов, то есть в момент времени 0, и каждой последующей новой координатой соответствующих атомов, полученной в результате вычисления молекулярной динамики. Общая формула расчета среднеквадратичного отклонения выглядит так:

$$RMSD_{(u,v)} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (u_i - v_i)^2} \quad (1.17)$$

где i – номер остатка;

u_i, v_i – значения координаты C_{α} -атома аминокислотного остатка;

n – общее количество остатков [117].

Среднеквадратичная флуктуация атомов (RMSF)

Среднеквадратичная флуктуация атома (*root-mean-square-fluctuation* – RMSF) показывает среднее отклонение положения частицы i на каждом шаге моделирования от усредненной координаты за все время вычисления молекулярной динамики:

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T (x_i(t_j) - \tilde{x}_i)^2}, \quad (1.18)$$

где T – общее количество шагов;

x_i – координата i -ого атома в данный момент времени t_j ;

$\tilde{x}_i$ – усредненная по времени координата i -ого атома.

Данный параметр позволяет определить подвижность аминокислотных остатков белка. Чем меньше значение RMSF для атомов, тем меньше их подвижность и выше жесткость структуры фермента [118].

Радиус инерции белка (R_g)

Радиус инерции R_g может быть интерпретирован как мера компактности белковой глобулы. В большинстве случаев это соответствует тому, насколько упорядоченные элементы вторичной структуры могут быть плотно уложены в соответствующую третичную структуру белка.

R_g рассчитывают по формуле:

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N m_i r_i^2}{\sum_{i=1}^N m_i}}, \quad (1.19)$$

где m_i – масса атома i ,

r_i – расстояние атома i от центра масс белка [119].

Таким образом радиус инерции отражает среднее расстояние от атомов белка до его центра масс.

Площадь поверхности, доступной растворителю (SASA)

Значение площади поверхности, доступной растворителю, (*solvent-accessible surface area* – SASA) отражает то, насколько атомы на поверхности белка могут образовывать связи с растворителем. Этот параметр всегда считался важным фактором в исследованиях фолдинга и стабильности белков. Расчет SASA происходит следующим образом: вся ван-дер-ваальсовая поверхность белка заполняется сферами радиусом 1,4 Å, что приблизительно соответствует размеру молекулы воды. Затем происходит расчёт площади для каждого аминокислотного остатка и всей поверхности белка в целом. Для МД-расчётов такой метод хорошо характеризует процессы фолдинга или денатурации структуры, а также экспонированность в растворитель аминокислотных остатков [120].

1.3.6 Организации молекул растворителя в первом гидратном слое белка.

Функция MDDF

Добавление осмолитов для изучения их влияния на структуру и функцию белков приводит к появлению эффекта предпочтительного взаимодействия, то есть к конкуренции взаимодействий между парами белок-осмолит и белок-вода. Концентрация соразтворителей и воды вблизи поверхности белка, называемая локальной, обычно значительно отличается от концентрации в объёмном растворителе, где влияние фермента на раствор отсутствует. Аккумуляция или исключение молекул соразтворителя с поверхности белковой глобулы количественно определяют, сравнивая отношения локальной и объёмной концентрации растворенного вещества. Такие эффекты характеризуют коэффициентом

предпочтительного взаимодействия, который рассчитывают на основе интегралов Кирквуда-Баффа (КБ) [121].

Интеграл Кирквуда-Баффа обеспечивает строгую связь между молекулярным распределением в растворе и его непосредственными термодинамическими характеристиками [122, 123.] На практике, теория Кирквуда-Баффа применяется при изучении предпочтительного исключения/связывания воды и других низкомолекулярных соединений различного типа с белками, для оценки уровня гидратации растворенного вещества и при моделировании условий макромолекулярного краудинга с помощью метода твердых сфер [122]. Такой подход широко используется в фармацевтике и пищевой промышленности, а также в качестве эталона при параметризации силовых полей в молекулярном моделировании [124].

Традиционно интеграл Кирквуда-Баффа G_{ij} для пары взаимодействующих веществ i и j определяется как интеграл по функции радиального распределения (RDF) центров масс молекул i (растворителя) относительно центра масс молекул j (белка):

$$G_{ij} = \int_0^{\infty} [g_{ij}(r) - 1] 4\pi r^2 dr \quad (1.20)$$

где r – расстояние между атомами белка и растворителя. Если расстояние вычисляется, например, между центрами масс фермента и молекулами окружения, $g_{ij}(r)$ функция радиального распределения

Однако такой подход не учитывает сложную форму как белковых глобул, так и молекул соразтворителей. Тем не менее, он широко применяется для изучения белков небольшого размера, в частности, таких как убиквитин и лизоцим в присутствии высоких концентраций глицерина и мочевины соответственно [29, 91, 92].

Для более точного описания сольватной оболочки белка в работах [125, 126] была предложена функция распределения минимального расстояния (MDDF). В отличие от RDF, для MDDF расчет распределения производится между ближайшим атомом растворителя и растворенного вещества, что позволяет учитывать сложную форму белков и осмолитов. На рисунке 1.3 на примере β -каротина в окружении воды показана разница между двумя подходами в описании сольватного микроокружения для органической молекулы несферической формы [126]. Рисунок 1.3, А демонстрирует сольватную сферу RDF – выборку молекул воды, наиболее близко расположенных к центру масс β -каротина. В свою очередь, на рисунке 1.3, Б показана сольватная оболочка, то есть те молекулы воды, чьи атомы находятся ближе всего к любому из атомов органической молекулы. В обоих случаях количество молекул растворителя составляет 559 штук.

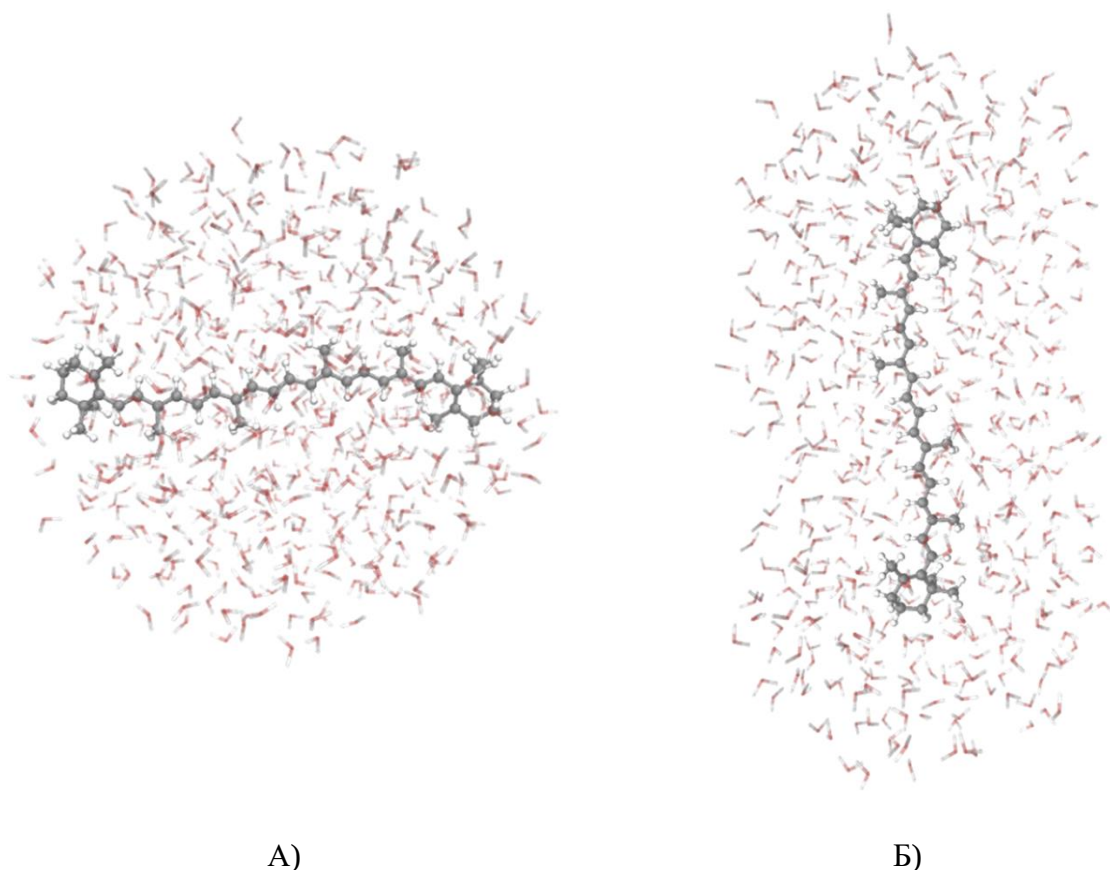


Рисунок 1.3 – Пример сольватной сферы (А) и сольватной оболочки (Б) молекулы β -каротина. Объяснения приведены в тексте выше. Адаптировано из [126].

Согласно [125] функция распределения минимального расстояния (MDDF) молекул растворителя относительно белковой глобулы $g_{pc}(r)$ рассчитывается как:

$$g_{pc}(r) = \frac{n_c(r)}{n_c^*}, \quad (1.21)$$

где $n_c(r)$ – плотность атомов соразтворителя встречающихся на минимальном расстоянии до любого атома белка, $n_c^*(r)$ – тоже самое распределение $n_c(r)$, но влияние присутствия белка на распределение молекул растворителя отсутствует, r – расстояние между атомами белка и растворителя.

В своей работе Мартинез и Шимизу показали [125], что MDDF можно использовать для расчёта интегралов Кирквуда-Баффа для молекул осмолитов:

$$G_{pc} = \frac{1}{p_c} \int_0^\infty [n_c(r) - n_c^*(r)] S(r) dr, \quad (1.22)$$

где p_c – общая плотность соразтворителя в растворе, $n_c(r)$ – плотность атомов соразтворителя, встречающихся на минимальной дистанции до любого атома белка, $n_c^*(r)$ –

плотность атомов соразтворителя в условиях, когда белок на любых r не оказывает влияние на молекулы соразтворителя, r – расстояние между атомами белка и растворителя, $S(r)$ – элемент площади поверхности на расстоянии r .

На практике интеграл G_{pc} рассчитывают на таком расстоянии $R < r$, где влияние присутствия белка на молекулы окружения пренебрежимо мало. Согласно МД-расчётам в работе [125] такое расстояние составляет $R \approx 10 \text{ \AA}$ от поверхности белка. Следовательно, интеграл 1.23 можно свести к:

$$G_{pc}(R) = \frac{1}{p_c} [N_{pc}(R) - N_{pc}^*(R)], \quad (1.23)$$

где p_c – общая плотность соразтворителя в бинарном растворе, $N_{pc}(R)$ – число атомов соразтворителя на минимальном расстоянии R от любого ближайшего атома белка, $N_{pc}^*(R)$ – число атомов соразтворителя в условиях, когда белок на любых R не оказывает влияния на молекулы соразтворителя, R – расстояние от поверхности фермента.

При таком подходе гидратным слоем (оболочкой) называется та область вблизи поверхности белка, где его влиянием на молекулы растворителя нельзя пренебречь ($r < R$). Интегралы Кирквуда-Баффа можно интерпретировать как избыточный объем, занимаемый соразтворителем в белковом домене, по сравнению со случайным распределением в объемном растворителе. Положительное значение интеграла Кирквуда-Баффа говорит об аккумуляровании молекул растворителя на поверхности белка, отрицательное – об исключении.

Разница между интегралами Кирквуда-Баффа для двух компонентов бинарного раствора показывает, какое из веществ предпочтительно связывается с белком. Коэффициент предпочтительного взаимодействия белка с соразтворителем Γ_{pc} может быть рассчитан по формуле:

$$\Gamma_{pc}(R) \approx p_c [G_{pc}(R) - G_{pw}(R)], \quad (1.24)$$

где p_c – общая плотность соразтворителя в бинарном растворе, $G_{pc}(R)$ – интеграл Кирквуда-Баффа для молекул соразтворителя, $G_{pw}(R)$ – для воды.

Аналогично, формулы 1.21 – 1.24 можно применить и для расчёта коэффициента предпочтительного взаимодействия белка с водой Γ_{pw} :

$$\Gamma_{pw}(R) \approx p_w [G_{pw}(R) - G_{pc}(R)], \quad (1.25)$$

где p_w – общая плотность соразтворителя в бинарном растворе, $G_{pw}(R)$ – интеграл Кирквуда-Баффа для молекул воды, $G_{pc}(R)$ – для соразтворителя.

1.4 Структура и функция бактериальной люциферазы

1.4.1 Биолюминесцентная реакция с участием бактериальной люциферазы

Живые организмы, излучающие свет видимого диапазона, встречаются в самых разных средах обитания, как в тропических джунглях и засушливых областях, так и на различных уровнях глубины океанов. Способность к биолюминесценции была обнаружена у насекомых, грибов, рыб и многих других групп живых организмов. Но на сегодняшний день все еще остается неясным вопрос, какую роль светоизлучение играет для жизнедеятельности организмов. Биологические функции биолюминесценции варьируют от вида к виду, их можно разделить на четыре основные группы: защита, контросвечение, привлечение добычи и внутривидовая коммуникация [127, 128]. Светоизлучение также наблюдается и у бактерий, преимущественно обитающих в морской воде. Аналогично многоклеточным организмам, биологическое значение биолюминесценции морских бактерий до сих пор неясно. Они могут быть свободно живущими в водной среде, колонизировать кожу морских животных в качестве сапрофитов, обитать внутри организмов в виде кишечных симбионтов либо паразитировать в их тканях [127].

Биолюминесцентные реакции представляют собой окислительные процессы, в которых субстрат превращается в электронно-возбужденный продукт, испускающий фотон видимого света при переходе в основное состояние. Такие реакции катализируются люциферазами – эволюционно разнообразной группой ферментов, которые схожи только по способу образования продукта в возбужденном состоянии, приводящему к биолюминесценции. Субстрат люциферазы – люциферин в различных биолюминесцентных реакциях может не совпадать [127, 129].

Бактериальная люцифераза катализирует окисление восстановленного флавиномононуклеотида (FMNH_2) и длинноцепочечного альдегида (RCHO) кислородом воздуха (O_2) (Рисунок 1.4, А). Однако ни один из субстратов биолюминесцентной реакции бактерий не может существовать в клетке в свободной форме. Так, FMNH_2 подвержен быстрому автоокислению, а альдегид является токсином и не аккумулируется внутри бактерий. В этом случае эффективная работа люциферазы достигается благодаря взаимодействию с другими ферментами. Альдегид поставляется в реакцию массивным комплексом восстановления карбоновой кислоты, состоящим из трех ферментов (трансферазу, синтазу и редуктазу) [13, 130]. Восстановление FMN осуществляется NAD(P)H-зависимыми оксидоредуктазами (Рисунок 1.4, Б). На практике, для получения стабильного свечения *in vitro* с целью исследования механизмов или применения в биоаналитических методах, широко используют биферментную систему NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+бактериальная люцифераза.

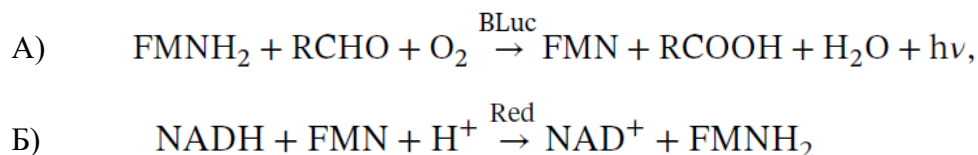


Рисунок 1.4 – Уравнение реакции, катализируемой люциферазой (А) и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой (Б) светящихся бактерий. BLuc – бактериальная люцифераза, Red – NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза, FMN и FMNH₂ – окисленная и восстановленная форма флавинмоноклетиды, RCHO и RCOOH – длинноцепочечный алифатический альдегид и соответствующая жирная кислота, H₂O – молекула воды, $h\nu$ – квант света с энергией около 485-490 нм [131].

Реакция, катализируемая бактериальной люциферазой, представляет собой много-стадийный процесс, её упрощенная кинетическая схема приведена на рисунке 1.5 [13].

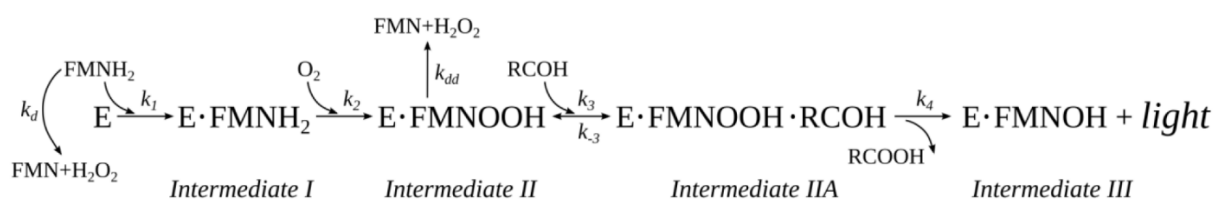


Рисунок 1.5 – Основные стадии биolumинесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой [13]. Объяснения приведены в тексте ниже.

На первом этапе происходит образования комплекса E·FMNH₂ (Интермедиата I) бактериальной люциферазы (E) с восстановленным флавином (FMNH₂), его характеризует константа скорости k₁. Затем образуется комплекс E·FMNHOON (Интермедиат II) вследствие реакции FMNH₂ с молекулярным кислородом в активном центре люциферазы с формированием 4а-гидроперокси-5-гидрофлавина, этот этап характеризует константа скорости k₂. Интермедиат IIА – 4а-пероксиполуацеталь-5-гидрофлавин (E·FMNHOON·RCHO), образуется в результате взаимодействия альдегида (RCHO) и 4а-гидроперокси-5-гидрофлавина (E·FMNHOON) в активном центре люциферазы, с константами скорости k₃ и k₋₃ для прямой и обратной реакции соответственно. Затем Интермедиата IIА распадается на карбоновую кислоту (RCOOH) и связанный с люциферазой электронно-возбужденный 4а-гидроксифлавин (E·FMNOH). Излучательная дезактивация Интермедиата III сопровождается

испусканием света. Скорость последнего этапа характеризуется константой k_4 , которая по сути является каталитической константой бактериальной люциферазы.

В отсутствие альдегида Интермедиат II протонируется и распадается по темновому пути с образованием перекиси водорода (H_2O_2) и окисленного флавина (FMN), с константой скорости стадии k_{dd} . Константа скорости k_d характеризует процесс неферментативного окисления $FMNH_2$ в растворе.

Примечательно, что люциферазы светящихся бактерий представляет собой флавиовую монооксигеназу и не имеют эволюционного родства с какой-либо люциферазой из других живых организмов [132]. Бактериальная люцифераза является необычным флавопротеином, поскольку восстановленный флавин в биохимической реакции используется в качестве субстрата, а не как кофактор. Не смотря на широкий интерес к данному классу ферментов, на сегодняшний день существует очень мало расшифрованных трехмерных структур [129].

1.4.2 Структурные особенности бактериальной люциферазы

Из всего разнообразия бактериальных люцифераз наиболее подробно расшифрована трехмерная структура только фермента из *Vibrio harveyi*. На сегодняшний день в белковой базе данных имеется три варианта полученных кристаллических структур. Первые две структуры были расшифрованы Фишером с соавторами в 1995 и 1996 гг. (PDB ID 1BRL и 1LUC соответственно) [129, 133]. Недостатком первых двух расшифрованных кристаллических структур являлось отсутствие важного для ферментативной функции участка мобильной петли ($\alpha 260$ – 290) в α -субъединице. Также обе трехмерные структуры были получены не в комплексе с субстратами биолюминесцентной реакции.

Бактериальная люцифераза представляет собой гетеродимер, состоящий из двух гомологичных субъединиц α и β , которые кодируются соседними генами *luxA* и *luxB* в *lux*-опероне светящихся бактерий. Взаимодействие между субъединицами осуществляется путём образования около 22-х водородных связей. Между собой последовательности субъединиц идентичны приблизительно на 30–32%. α -субъединица обычно больше, чем β -субъединица (40–42 и 36–37 кДа соответственно). Разница в размере обусловлена наличием в α -субъединице дополнительных 29-и аминокислотных остатков в положении около $\alpha 260$ – 290 [131]. Анализ последовательностей известных в настоящее время бактериальных люцифераз показал высокое сродство между ферментами, поскольку около 30% остатков полностью консервативны в обеих субъединицах [131, 134]. Роль β -субъединицы для каталитической функции сегодня еще не вполне ясна. Предполагается, что она стабилизирует

каталитически активную α -субъединицу, так как при ее удалении происходит значительное снижение квантового выхода биolumинесцентной реакции [129, 133].

В 2009 г. Кэмпбелл с коллегами расшифровали третью кристаллическую структуру бактериальной люциферазы в комплексе с флавиномононуклеотидом (PDB ID 3FGC) (Рисунок 1.6) [134]. Сегмент не расшифрованного участка мобильной петли в этом случае значительно уменьшился – с 30-ти до 7-ми аминокислотных остатков (α 283–290). О том, что активный центр люциферазы находится на α -субъединице, было известно еще до получения этого кристалла [127, 129–135]. Расшифрованный комплекс фермента с продуктом реакции позволил определить аминокислотные остатки сайта связывания флавина: α Phe6, α Lys42, α Glu43, α Ala74, α Ala75, α Val77, α Cys106, α Agr107, α Lys109, α Tyr110, α Agr125, α Val173, α Glu175, α Ser176, α Thr179 и α Trp192 [134]. Некоторые из этих аминокислот были подвергнуты направленному мутагенезу, с целью понимания того, насколько они функционально значимы для биolumинесцентной активности люциферазы (Таблица 1.5). Под *оборотной* стороной флавина расположены аминокислотные остатки α Cys106, два гидрофобных остатка α Val173, α Ile191 и цис-пептидная связь α Ala74–Ala75 (Рисунок 1.7, А). Все они находятся ближе ко дну активного центра фермента.

Было выявлено, что α Cys106 важен для стабильности интермедиата биolumинесцентной реакции (4а-пероксифлавина) и связывания альдегида [131]. Показано, что алкилирование α Cys106 нарушает связывание FMNH₂ и альдегида в активном центре люциферазы. Замена этого остатка на Ala, Ser и Val дестабилизировала 4а-пероксифлавин, вследствие чего скорость распада этого интермедиата (k_{dd}) становилась в два раза больше по сравнению с диким типом. Цис-пептидная связь между α Ala74 и Ala75 создает небольшую полость на дне активного центра бактериальной люциферазы *V. harveyi*. Предполагается, что такая конфигурация способствует правильному позиционированию некоторых каталитически важных остатков. Замена α Ala75 на Gly или Phe снижала квантовый выход биolumинесцентной реакции на два-три порядка. Двойной мутагенез α Cys106Val и α Ala75Gly приводил к смещению длины волны излучения биolumинесцентной реакции в красную область на 10 нм. В свою очередь, одновременная замена α Cys106Val, α Ala75Gly, α Val173Cys или α Val173Ala аналогично приводило к смещению спектра на 12–15 нм [131].

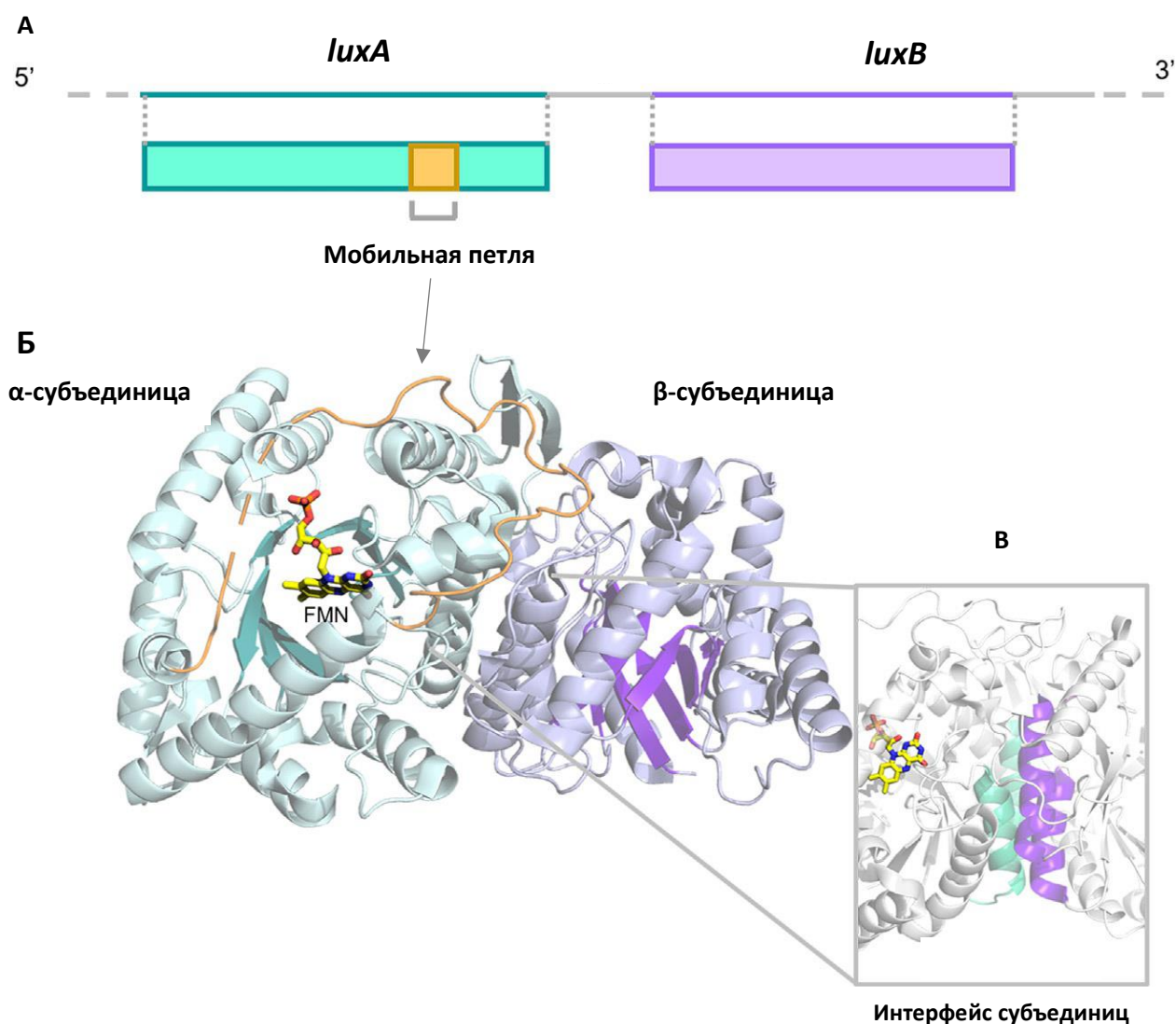


Рисунок 1.6 – (А) Гены *luxA* и *luxB* в *lux*-опероне, кодирующие α - и β -субъединицы соответственно. (Б) Расшифрованная кристаллическая структура люциферазы *V. harveyi* в комплексе с FMN (PDB ID 3FGC). α - и β -субъединицы отображены в ленточном представлении в светло-зеленом и светло-фиолетовом цвете соответственно, FMN – в стержневом представлении. Последовательность α -субъединицы содержит неструктурированный участок мобильной петли (оранжевый цвет). (В) Расположение межсубъединичного интерфейса [131, 134].

Около *лицевой* стороны изоаллоксазинового кольца флавина гидрофобные остатки Trp194, Phe6 и Ser227 образуют гидрофобный карман. Предполагается, что это возможный сайт связывания альдегида (Рисунок 1.7, Б).

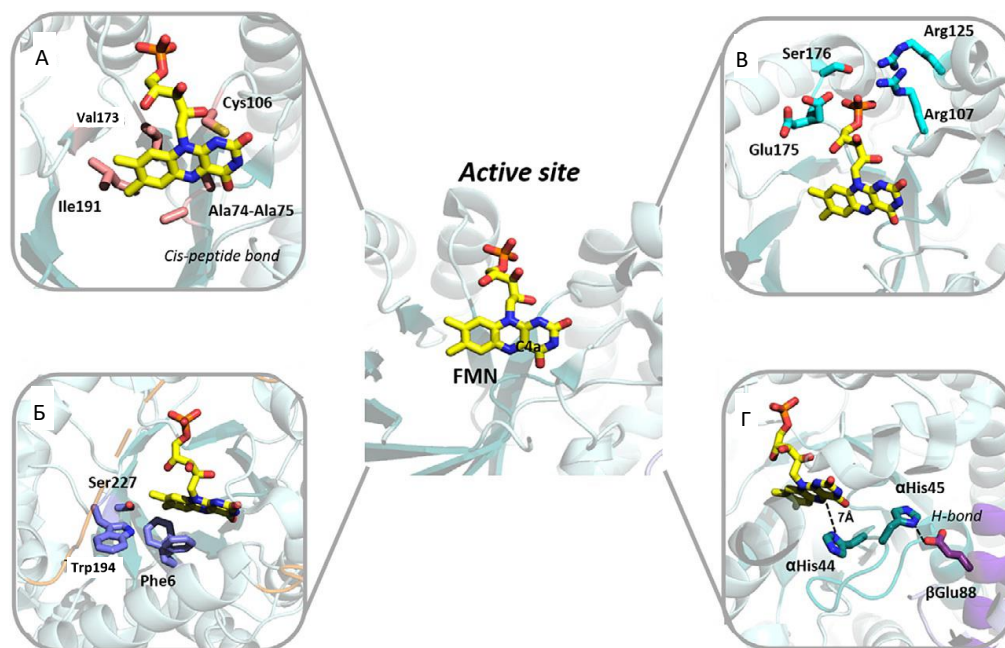


Рисунок 1.7 – Известные функционально важные аминокислотные остатки бактериальной люциферазы *V. harveyi*, формирующие сайт связывания флавина [131].

Как показано на рисунке 1.7. В, фосфатная группа FMN находится ближе ко входу в активный центр и окружена боковыми цепями α Arg107, α Arg125, α Glu175 и α Ser176. Мутация консервативного α Arg107 практически никак не отразилась на образовании и стабильности интермедиата 4а-пероксифлавина, но значительно снизило способность люциферазы к образованию комплекса с FMNH₂ [15]. Интересные результаты были получены для консервативного α Glu175. В расшифрованных кристаллических структурах бактериальной люциферазы *V. harveyi* боковая цепь этого остатка может принимать две конформации (Рисунок 1.7, Г). Первая из них образует сильную водородную связь с боковой цепью α Ser176. Как было показано с помощью методов молекулярного докинга, при такой конформации возникают стерические ограничения, затрудняющие образование комплекса фермента с восстановленным флавином. Следовательно, каталитически активное положение боковой цепи α Glu175 должно быть ориентировано вглубь активного центра люциферазы [134, 136]. Замена этого аминокислотного остатка также снижает сродство с альдегидом и стабильность 4а-пероксифлавина [131].

Пара α His44–His45 близка к пиримидиновой части изоаллоксазинового кольца флавина (Рисунок 1.7, Г). Эти два остатка преимущественно консервативны среди бактериальных люцифераз. В расшифрованных кристаллических структурах отмечено, что α His45 образует водородную связь с консервативным β Glu88 из β -субъединицы [131].

Таблица 1.5 – Влияние мутаций аминокислотных остатков на функционирование бактериальной люциферазы [131]

Аминокислотный остаток	Мутация	Результат мутации
α Asp113	α Asp113Asn	Уменьшение биолуминесцентной активности
α Ser227	α Ser227Phe	
α Cys106	α Cys106Val/Ala	
α His44	α His44Ala	
α Ala74–Ala75	α Ala74Phe/Gly	
α Lys283	α Lys283Ala	
α Lys286	α Lys286Ala	
β Tyr151	β Tyr151Ala/Asp/Trp	
α Val173	α Val173Ala/Cys/Thr/Ser	Изменение длины волны светоизлучения
α Cys106	α Cys106Val	
α Ala75	α Ala75Gly	
α Asp113	α Asp113Asn	
α Glu175	α Glu175Gly	Увеличение константы спада биолуминесценции
α Glu175	α Glu175Gly	Уменьшение времени жизни Интермедиата II (4а-пероксифлавина)
α Cys106	α Cys106Val/Ala	
α Lys283	α Lys283Ala	

Замена любого из аминокислотных остатков этой пары приводит к заметному снижению активности люциферазы [134]. Также было показано, что α His45 важен для стабильности пероксифлавинового интермедиата и связывания с FMNH₂. Замена α His45Ala исключила возможность образования комплекса люциферазы с FMNH₂. В работе [137] показано, что мутация α His44Ala снижала эффективность протекания биолуминесцентной реакции в шесть раз.

Участок мобильной петли также функционально значим для выполнения люциферазой катализа. Считается, что этот сегмент стабилизирует интермедиаты биолуминесцентной реакции и предотвращает попадание молекул растворителя в активный центр после связывании белка с флавином. Более того, химическое удаление этого участка снижает в два раза квантовый выход биолуминесценции [138].

Стоит отметить, что в белковом банке данных также представлена β -субъединица люциферазы *Photobacterium leiognathi* (PDB ID 6FRI). Но отсутствие структуры каталитически активной α -субъединицы усложняет изучение данного фермента [139].

Глава 2. Методы исследования

2.1 Подготовка трехмерных структур ферментов для расчета молекулярно-динамических траекторий

В настоящее время исследование молекулярной динамики биологических макромолекул методом компьютерного моделирования включает в себя следующие этапы: i) подготовка трехмерных структур исследуемых молекул и конструирование модельных систем (модельных боксов), ii) проведение нескольких этапов релаксации моделируемых систем, iii) расчет молекулярной динамики модельных систем при различных условиях, iv) анализ полученных траекторий, исходя из цели исследования.

В данном диссертационном исследовании было изучено влияние осмолитов на структуру ферментов на примере двух бактериальных люцифераз – *V. harveyi* и *P. leiognathi*. Как было отмечено в разделе 1.4.2 литературного обзора, на данный момент методами рентгеноструктурного анализа полностью расшифрована структура только люциферазы *V. harveyi*. Однако кристаллическая структура люциферазы 3FGC, полученная с наилучшим разрешением и со связанным продуктом реакции [134], имеет нерасшифрованные сегменты: участок мобильной петли α -субъединицы (283–290 а.о.) и С-конец β -субъединицы (319–324 а.о.). Недостающие участки уже расшифрованных кристаллов реконструируют, опираясь на известную аминокислотную последовательность белка, с помощью программного пакета MODELLER, интегрированного в графический интерфейс CHIMERA 1.15 [139, 140]. Результатом реконструирования является набор конформаций достраиваемых сегментов структуры, чье соответствие реальной возможной структуре оценивается по двум параметрам. Первый – GMQE – оценивает качество третичной структуры полученной модели (чем ближе к 1, тем точнее модель). Второй – QMEAN Z-score – показывает, насколько отличается реконструированная белковая глобула от экспериментально полученных структур. Значения около –4 означают, что получившиеся модели низкого качества. Данный подход был использован для восстановления структуры сегментов люциферазы *V. harveyi*, не разрешённых в кристаллической структуре 3FGC.

Реконструирование трехмерной организации белков, для которых пока не расшифрованы кристаллические структуры, требует иных подходов. Одним из возможных методов предсказания пространственной укладки белковой глобулы является ее моделирование по гомологии. Суть метода заключается в поиске уже расшифрованного кристалла белка-гомолога (шаблона), на основе которого будет смоделирована структура родственного белка.

Он-лайн инструментарий для реконструирования пространственной организации белка по известной первичной последовательности предоставляет веб-сервис SWISS-

MODEL [142]. Моделирование неизвестной структуры белка по гомологии включает в себя несколько этапов:

1. Идентификация структурного шаблона – белка с известной пространственной структурой, гомологичного моделируемому (идентичность последовательностей >30%);
2. Построение выравнивания аминокислотных последовательностей шаблона и модели;
3. Построение модели трехмерной структуры белка при помощи «натягивания» последовательности моделируемого белка на «остов» шаблона согласно выравниванию.

Веб-сервис SWISS-MODEL проводит поиск наиболее оптимальных структур-шаблонов по нескольким параметрам:

1. **Coverage** – указывает, насколько хорошо полипептидная цепь моделируемой структуры схожа по длине со структурой-шаблоном;
2. **GMQE (Global Model Quality Estimation)** – данный параметр представляет собой качественную оценку созданной модели относительно выбранной структуры шаблона;
3. **Identity** – показывает идентичность последовательности моделируемого белка и выбранной структуры-шаблона;
4. **Method** – метод расшифровки известной кристаллической структуры белка;
5. **Oligo State** – показывает количество полипептидных цепей в структуре-шаблоне;
6. **Ligand** – наличие/отсутствие лиганда в расшифрованной структуре-шаблоне.

В данной работе для моделирования по гомологии трехмерной структуры люциферазы *P. leiognathi* с помощью веб-сервиса SWISS-MODEL использовали первичную последовательность α -субъединицы (ID P09140) и β -субъединицы (ID P09141) этого фермента из базы данных UniProt [143, 145]. В качестве структуры-шаблона была выбрана кристаллическая структура люциферазы *V. harveyi* (PDB ID 3FGC) [134]. Это обусловлено, с одной стороны, тем, что данные бактериальные люциферазы обладают высоко гомологичными первичными последовательностями: 54,08 и 45,45% гомологичных аминокислотных остатков для α - и β -субъединиц соответственно. Согласно параметрам поиска веб-сервиса SWISS-MODEL структура люциферазы *V. harveyi* (PDB ID 3FGC) также является наиболее подходящим шаблоном для реконструирования трехмерной структуры люциферазы *P. leiognathi*.

2.2 Подготовка модельных систем, включающих бактериальные люциферазы в присутствии разных осмолитов

Для определения механизмов влияния осмолитов на структурно-динамические характеристики бактериальных люцифераз *V. harveyi* и *P. leiognathi* было проведено две основные серии расчетов молекулярной динамики этих белков: i) в присутствии пяти

осмолитов различной структуры и молекулярного размера (содержание соответствует 40 вес.%), и ii) в присутствии различных концентраций (5, 10, 20, 30 вес.%) глицерина или сахарозы, представляющих собой осмолиты с самым маленьким и самым большим молекулярным размером соответственно. Структура исследованных осмолитов приведена на рисунке 2.1.



Рисунок 2.1 – Структура осмолитов, исследованных в работе, и их эффективный гидродинамический радиус [14]. Структуры представлены в виде шаро-стержневой модели: серым цветом показаны атомы углерода, красным – кислорода, белым – водорода.

Подготовку и расчет молекулярной динамики люцифераз в окружении молекул воды и смесей воды с осмолитами проводили с использованием программного пакета GROMACS 2020.04 [145]. Взаимодействия между атомами в моделируемых системах описывали с помощью силового поля CHARMM36 [113]. Молекулы белка, воды и осмолитов были представлены в явном виде. Файлы силового поля для описания осмолитов были взяты из библиотеки низкомолекулярных соединений CHARMM36 (CHARMM Small Molecule Library) [146]. В исследовании использовали модель β -формы глюкозы, так как она является преобладающей в растворах [147].

Нижеописанные шаги подготовки моделируемых систем являются одинаковыми для всех серий молекулярно-динамических расчетов бактериальных люцифераз. Стоит отметить, что значения таких параметров, как размер модельного бокса, радиусы отсечек всех межатомных взаимодействий и т.д. были выбраны согласно рекомендациям для силового поля CHARMM36 [113]. В частности:

- размер модельного бокса составлял $106,72 \text{ Å}^3$;
- расстояние, на котором величина ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий между атомами системы становилась равной нулю, составляло 12 Å ;
- электростатические взаимодействия рассматривались с использованием метода Эвальда [148].

На первом шаге подготовки к расчету молекулярной динамики трехмерную структуру белка помещали в центр кубического бокса с периодическими граничными условиями. Расстояние между стенками бокса и ферментом составляло $>12 \text{ \AA}$ от любого атома белка. Для моделирования раствора осмолита определенной концентрации бокс заполняли необходимым количеством молекул воды и осмолитов (Таблицы 2.1-2.2). Примеры модельных боксов приведены на рисунке 2.2.

Таблица 2.1 – Количество молекул воды и осмолитов в модельном боксе с бактериальными люциферазами, использованное для моделирования растворов с концентрацией 40 вес.%

№	Осмолит	Количество молекул воды/осмолита в боксе с люциферазой, шт.	
		<i>P. leiognathi</i>	<i>V. harveyi</i>
1	Этиленгликоль	24363 / 4925	23185 / 4733
2	Глицерин	25928 / 3320	27622 / 858
3	Сорбитол	27389 / 1678	26111 / 1613
4	Глюкоза	28211 / 1697	26853 / 1631
5	Сахароза	28938 / 893	27622 / 858

Таблица 2.2 – Количество молекул воды и осмолитов для моделирования растворов различных концентраций в модельных системах с бактериальными люциферазами

№	Моделируемая концентрация глицерина/сахарозы, вес.%	Количество молекул воды/осмолита в боксе, шт.			
		<i>P. leiognathi</i>		<i>V. harveyi</i>	
		Глицерин	Сахароза	Глицерин	Сахароза
1	0	42456 / 0		40803 / 0	
2	5	40243 / 415	40745 / 112	38650 / 399	39127 / 107
3	10	38098 / 830	39006 / 224	36496 / 798	37432 / 215
4	20	33832 / 1660	35614 / 447	32363 / 1595	34150 / 429
5	30	29763 / 2490	32320 / 670	28415 / 2393	30859 / 644
6	40	25928 / 3320	28938 / 893	24641 / 3190	27622 / 858

Общий заряд системы в присутствии люцифераз был равен: для *P. leiognathi* –30е, для *V. harveyi* –35е. Он был нейтрализован путем добавления соответствующего количества положительно заряженных ионов натрия (+1е каждый).

Для сохранения стабильности системы был выбран шаг моделирования 2,0 фс.

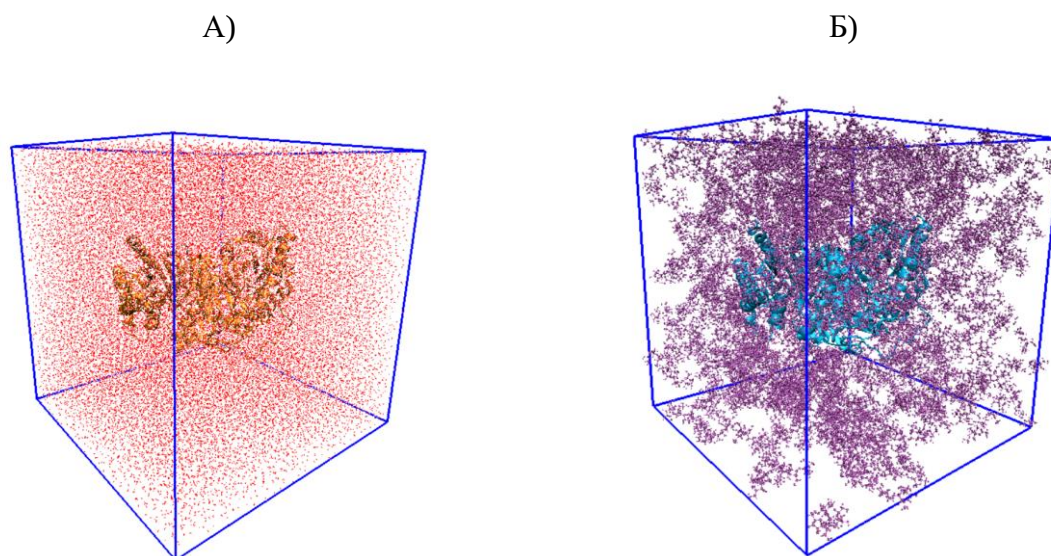


Рисунок 2.2 – Примеры модельных боксов с молекулами люциферазы: (А) люцифераза *P. leiognathi* с молекулами воды, (Б) люцифераза *V. harveyi* с молекулами сахарозы (40%), визуализация воды отключена.

Далее для каждой модельной системы была проведена минимизация энергии с помощью метода быстрого спуска, целью которой является приближение структуры к энергетическому минимуму [111]. Этот процесс применяется для всех атомов структуры, которые, в конечном счете, изменяют своё положение, уменьшая свою потенциальную энергию. Процедура минимизации считается успешной, когда максимальное значение на любом из атомов не будет превышать заданного максимума (1000 кДж/моль).

Затем были проведены два этапа релаксации системы при изохорно-изотермических (NVT-ансамбль) и изотермо-изобарических (NPT-ансамбль) условиях, каждый по 10 нс. Данные этапы релаксации были направлены на приведение моделируемой системы к определённым условиям: температуре 300 К и давлению 10^5 Па, для последующего расчета молекулярной динамики. Следует отметить, что при моделировании структуры ферментов при 5, 15, 45 и 60 °С температура системы была зафиксирована при 278, 288, 318, 333 К соответственно. Положение тяжелых атомов белка на этапах релаксации было зафиксировано. Для поддержания заданных значений температуры и давления на всех этапах релаксации и расчёта молекулярно-динамических траекторий был использован модифицированный термостат Берендсена и баростат Парринелло-Рахмана [149, 150].

Длительность моделируемой молекулярной динамики составляла не менее 100 нс. Сохранение молекулярно-динамических траекторий происходило каждые 10 пс, т.к. ранее было показано, что более частое сохранение координат атомов не влияет на точность

получаемых результатов [29]. Расчет траектории для каждой системы проводили не менее трех раз (включая этапы минимизации и релаксации) для последующего статистического анализа полученных результатов.

2.3 Анализ молекулярно-динамических траекторий

Структурно-динамические характеристик белковой глобулы.

Такие параметры как среднеквадратичное отклонение (RMSD) и среднеквадратичная флуктуация (RMSF) C α -атомов бактериальных люцифераз, а также радиус инерции (R $_g$) и площадь поверхности, доступной растворителю (SASA) белков были рассчитаны с помощью программного пакета GROMACS 2020.04, согласно принципам, представленным в разделе 1.3.5. Бактериальные люциферазы *P. leiognathi* и *V. harveyi* являются достаточно большими белками. Поэтому при сравнении структурных параметров в присутствии разных осмолитов анализировали величины для последних 20-ти нс молекулярно-динамических траекторий, чтобы исключить влияние релаксации белка во время первой половины моделирования динамики.

Сравнение подвижности аминокислотных остатков при изменении температуры или в присутствии осмолитов проводили по разностному параметру ΔRMSF :

$$\Delta\text{RMSF} = \text{RMSF}_{0,T} - \text{RMSF}_C, \quad (2.1)$$

где RMSF_C – значение среднеквадратичной флуктуации C α -атома белка в окружении молекул воды при 300 K, $\text{RMSF}_{0,T}$ – значение параметра в присутствии осмолита и/или при другой температуре.

Таким образом, $\Delta\text{RMSF} < 0$ C α -атома указывает на уменьшение амплитуды его флуктуаций (подвижности) под действием анализируемого фактора, в то время как $\Delta\text{RMSF} > 0$ говорит об увеличении подвижности.

Оценка доступности активного центра бактериальных люцифераз для молекул воды и осмолитов

Область активного центра люцифераз была определена с помощью онлайн сервиса CASTp, позволяющего выявить полости на поверхности белков и описать аминокислотные остатки, которые участвуют в их формировании [151]. Каталитическая полость люциферазы *V. harveyi* была определена для ее кристаллической структуры из банка данных белковых структур (PDB ID 3FGC). Для люциферазы *P. leiognathi* была использована структура, полученная в результате реконструирования по гомологии.

Для определения объема полости активного центра люцифераз на каждом шаге моделирования был использован разработанный для GROMACS плагин *trj_cavity 2.0* [89]. Также этот плагин позволяет определять проникновение атомов окружения в полость активного центра. Проводили подсчет атомов воды/осмолитов, присутствующих на каждом шаге моделирования в полости активного центра люциферазы. Из-за сложной геометрии молекул воды и осмолитов оценить доступность активного центра на уровне молекул не представлялось возможным. Преимущество этого плагина также заключается в том, что он позволяет определять объем активного центра, основываясь на ван-дер-ваальсовых радиусах атомов и стерических ограничениях, вызванных формой соответствующей полости фермента. Расчет проводился для группы аминокислотных остатков, формирующих активный центр, полученных по результатам анализа CASTp. Запуск плагина *trj_cavity 2.0* был произведен согласно настройкам по умолчанию, как рекомендовано для анализа каталитических карманов белковых глобул.

Анализ гидратного слоя бактериальных люцифераз в присутствии осмолитов

Для анализа влияния осмолитов на состав гидратной оболочки бактериальных люцифераз использовали функцию распределения минимального расстояния (MDDF). Расчет данной функции интегрирован в свободно распространяемый модуль *Complex-Mixtures.jl*, реализованный на программном языке Julia. MDDF для молекул воды и осмолитов рассчитывался на расстоянии до 10 Å от атомов белка. Далее, на основе получившихся радиальных распределений, для моделируемых систем по формулам 1.25 и 1.26 был произведен расчет коэффициентов предпочтительного связывания/исключения для молекул воды осмолитов.

Двухмерное представление распределения минимального расстояния молекул осмолитов было произведено для функционально важных участков структур люцифераз. Оценка проводилась на расстоянии 1,5-3,5 Å (первый гидратный слой белка), которое считается оптимальным для образования сильных водородных связей [150,]. Такие карты строились с помощью Matplotlib – библиотеки на языке программирования Python.

Расчет энергий нековалентных взаимодействий между компонентами моделируемых систем

Энергии кулоновских и ван-дер-ваальсовых взаимодействий рассчитывали с помощью программного пакета GROMACS на основе МД-траекторий структур люцифераз в воде и водных растворах осмолитов. Оценка была проведена для следующих пар компонентов моделируемых систем: белок-белок, белок-вода, белок осмолит, осмолит-вода.

Визуализация полученных результатов

Для отображения и анализа рассчитанных молекулярно-динамических траекторий были использованы CHIMERA 1.15 и VMD (Visual Molecular Dynamics) 1.9.2 [141, 153].

2.4 Расчет молекулярной динамики субстратов биолюминесцентной системы бактерий в присутствии осмолитов

Был выполнен расчет молекулярной динамики трехмерных структур NADH и FMN в воде и смеси воды с глицерином или сахарозой (соответствующей концентрации осмолита 40 вес.%). Количество молекул для моделирования таких систем приведено в таблице 2.3. Размер модельного бокса составлял $50 \text{ \AA}^3$ для NADH и FMN. Трехмерные структуры и файлы параметризации для обоих нуклеотидов были взяты из библиотеки CHARMM [146]. Параметры силового поля CHARMM36, этапы минимизации энергии и релаксации систем, а также время моделирования (100 нс) были аналогичны таковым, описанным для структур бактериальных люцифераз. Отличием являлось только время расчета этапов релаксации NVT- и NPT-ансамбля – оно составило 1 нс. Для каждой из систем было проведено три независимых запуска молекулярной динамики со всеми этапа минимизации и релаксации.

Таблица 2.3 – Количество молекул воды и глицерина для моделирования влияния на субстраты биолюминесцентной системы бактерий FMN и NADH

Моделируемая концентрация глицерина / сахарозы	Количество молекул воды/осмолита в боксе с субстратом, шт.	
	FMN	NADH
0%	4033 / 0	4025 / 0
Глицерин, 40 вес.%	2385 / 315	2396 / 315
Сахароза, 40 вес.%	2747 / 85	2715 / 85

Водородные связи между тяжелыми атомами субстратов (C, N, O, P) и молекулами растворителя на каждом шаге МД-траектории рассчитывали с помощью плагина GROMACS *gmx hbond*. Наличие такого взаимодействия между парой атомов определялось по следующим геометрическим критериям: (i) расстояние между донором и акцептором связи, которое составляло $\leq 3,5 \text{ \AA}$ и (ii) угол между атомом водорода, тяжелым атомом донора и акцептором, который составлял $< 30^\circ$ [145, 153]. Заселенность водородных связей определялась как процент отличного от нуля количества связей между конкретным атомом нуклеотида и водой/осмолитом, по сравнению с общим временем моделирования.

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

3.1 Получение трехмерных структур бактериальных люцифераз

Восстановление недостающих сегментов кристаллической структуры бактериальной люциферазы V. harveyi

В кристаллической структуре люциферазы *V. harveyi* (PDB ID 3FGC), полученной для фермента в комплексе с FMN [134], не были разрешены некоторые фрагменты (см. детали в разделе 2.1). Участки трехмерной структуры, реконструированные с помощью программного пакета MODELLER, интегрированного в графический интерфейс CHIMERA 1.15, представлены на рисунке 3.1. Уже известная пространственная организация соседних элементов структуры белка позволяет говорить о высокой степени достоверности полученных результатов. Так, достроенный участок мобильной петли α -субъединицы (аминокислотные остатки $\alpha 283$ - $\alpha 289$) является неструктурированным сегментом без элементов вторичной структуры. В свою очередь, участок $\beta 319$ - $\beta 324$ представляет собой С-конец β -субъединицы, который продолжает уже известную альфа спираль. Было реконструировано пять возможных моделей укладки для каждого из недостающих участков первичной последовательности. На рисунке 3.1 наиболее вероятные, согласно оценке MODELLER, конформации реконструируемых сегментов отображены красным и зелёным цветом.

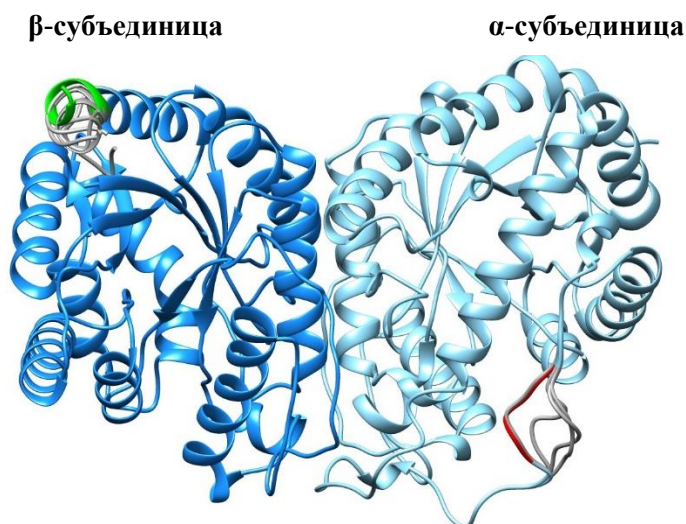


Рисунок 3.1 – Реконструированные участки мобильной петли α -субъединицы (красный) и С-конца β -субъединицы (зеленый) кристаллической структуры бактериальной люциферазы *V. harveyi* (PDB ID: 3FGC). Серым цветом отображены другие возможные конформации, которые в дальнейшем в работе не использовались.

*Реконструирование трехмерной структуры бактериальной люциферазы *P. leiognathi**

Кристаллическая структура бактериальной люциферазы *V. harveyi* (3FGC) с достроенными элементами была использована в качестве шаблона для реконструирования структуры люциферазы *P. leiognathi*. Высокая гомологичность двух исследуемых люцифераз обеспечила высокое качество полученной белковой глобулы. Значения параметров оценки качества SWISS-MODEL: GMQE = 0,86 и QMEAN-Z = -0,58 указывают на то, что практически все аминокислотные остатки реконструированного белка имеют укладку, характерную для большинства аналогичных белков со схожими последовательностями (Рисунок 3.2).

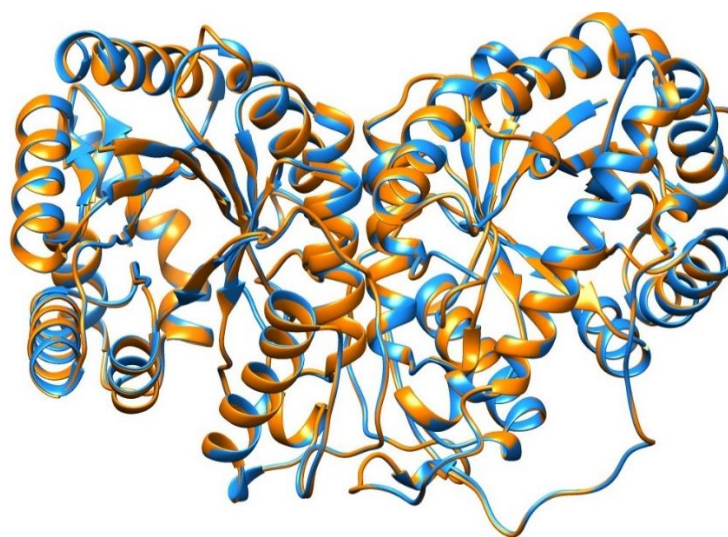


Рисунок 3.2 – Трехмерная структура бактериальной люциферазы *P. leiognathi*, реконструированная по гомологии (оранжевый). В качестве шаблона была использована структура люциферазы *V. harveyi* (голубой).

Как было отмечено в разделе 1.4.2 литературного обзора, для люциферазы *P. leiognathi* была получена кристаллическая структура β -субъединицы (PDB ID: 6FRI) [139]. На рисунке 3.3, А представлен результат структурного выравнивания реконструированной β -субъединицы относительно 6FRI с помощью программного пакета CHIMERA 1.15 [141]. Величина среднеквадратичного отклонения атомов (RMSD), позволяющая оценить, насколько элементы двух структур имеют идентичное положение, показана на рисунке 3.3, Б. Видно, что β -субъединицы хорошо выравниваются в пространстве между собой. Цветовой градиент RMSD показывает, что отклонения элементов смоделированной структуры от кристаллизованной не превышает 1-2 Å по всей последовательности. Исключение составляет аминокислотный остаток β Asn169, для которого параметр

среднеквадратичного отклонения максимален и составляет 5,50 Å. Высокое значение RMSD объясняется отсутствием вторичной структуры на этом сегменте β -субъединицы, и как следствие, большей подвижностью в целом.

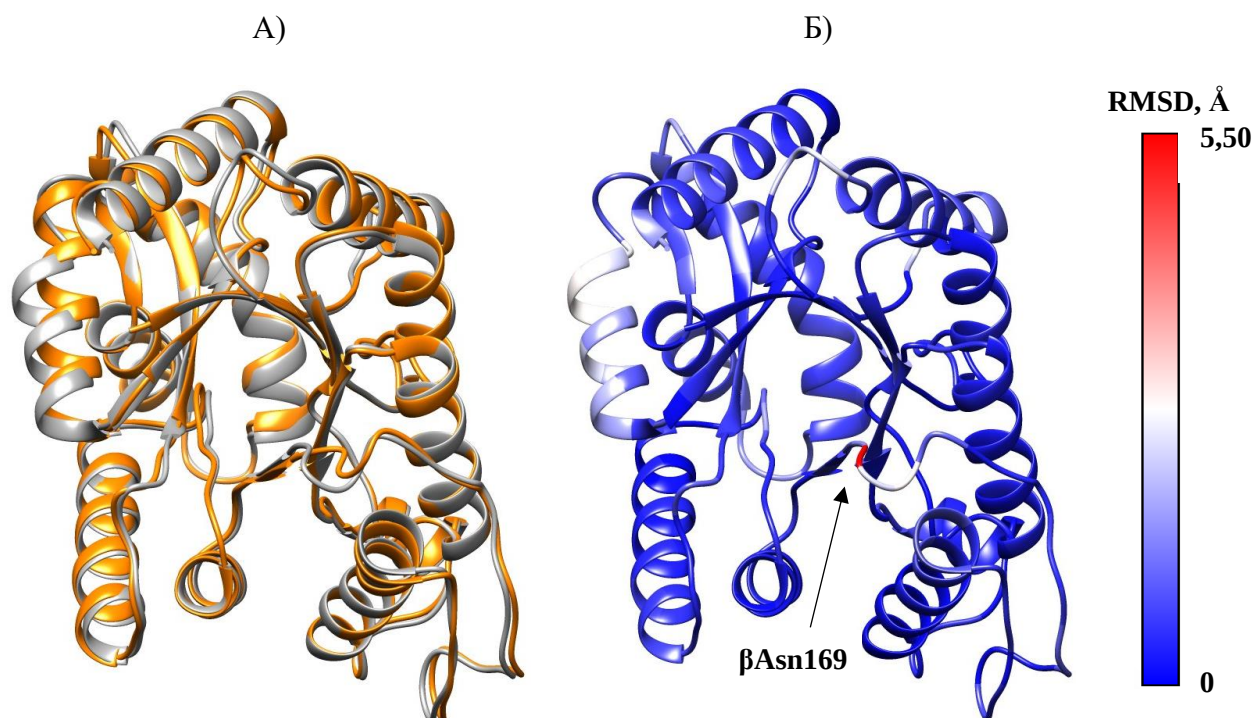


Рисунок 3.3 – Трехмерная структура β -субъединицы бактериальной люциферазы *P. leiognathi*: (А) выравнивание структуры, реконструированной по гомологии, (оранжевый) с расшифрованной кристаллической структурой 6FRI (серый), (Б) градиентный окрас реконструированной структуры β -субъединицы согласно значению RMSD C_{α} -атомов.

Получение трехмерной структуры фермента бактерий *P. leiognathi* позволило в дальнейшем проводить вычислительное моделирование эффектов соразтворителей в условиях, максимально приближенных к экспериментальным, поскольку влияние вязких сред исследовали именно на этом ферменте [13, 14, 154, 155].

3.2 Структурные особенности бактериальных люцифераз *V. harveyi* и *P. leiognathi*

Стоит отметить, что несмотря на высокую гомологичность первичных последовательностей исследуемых люцифераз и на их одинаковую длину (679 аминокислотных остатков), между белками есть различия. При выравнивании структур последовательность люциферазы *V. harveyi* была использована в качестве шаблона. Обнаружено, что α -субъединица белка *V. harveyi*, состоящая из 355-ти аминокислотных остатков, длиннее на один

остаток, чем α -субъединица фермента *P. leiognathi*, так как у последней отсутствует аминокислота в положении $\alpha 166$. При этом β -субъединица *P. leiognathi*, состоящая из 325-ти аминокислотных остатков, длиннее на один остаток, чем β -субъединица *V. harveyi*. Тем не менее, длина выравнивания β -субъединицы составила 326 из-за отсутствия у *V. harveyi* аминокислот в положении $\beta 34$ и $\beta 35$ и наличия дополнительной вставки в конце последовательности.

Сравнение первичных последовательностей люцифераз не выявило серьезных различий в общем содержании отдельных аминокислотных остатков (Таблица 3.1). Анализ проводился в веб-сервисе Peptide 2.0.

Таблица 3.1 – Содержание аминокислотных остатков каждого типа в первичной последовательности бактериальных люцифераз

Аминокислотный остаток	Доля от общего количества аминокислотных остатков в последовательности люциферазы, %	
	<i>V. harveyi</i>	<i>P. leiognathi</i>
Ala	8,69	6,19
Cys	2,07	1,48
Gly	6,34	5,6
Val	6,93	5,31
Leu	7,66	7,96
Ile	4,57	6,63
Met	2,66	3,54
Ser	5,75	5,6
Thr	5,31	6,49
Phe	5,9	5,31
Tyr	3,83	4,13
Trp	1,18	1,04
Asp	6,78	6,49
Glu	7,37	7,81
Asn	5,75	6,63
Gln	3,98	3,54
His	3,39	3,39
Lys	5,16	5,90
Arg	3,83	3,98
Pro	2,95	3,10

Также было проведено сравнение доли аминокислотных остатков люцифераз, вовлеченных в элементы вторичной структуры (α -спирали и β -тяжи). Оценку проводили с помощью веб-сервиса **2Struc** [158], результаты представлены в таблице 3.2. Было получено, что различия в последовательностях люцифераз из двух видов светящихся бактерий не привели к существенным различиям вторичной структуры этих белков.

Таблица 3.2 – Доля аминокислотных остатков бактериальных люцифераз, вовлеченных в элементы вторичной структуры

Элементы структуры	Доля от общего количества аминокислотных остатков в последовательности люциферазы, %	
	<i>V. harveyi</i>	<i>P. leiognathi</i>
α -спирали	48,5	47,1
β -структуры	15,5	15,4
Неструктурированные участки	36,1	37,5

Современные теоретические методы способны по известной аминокислотной последовательности белка предсказать вероятность для каждой аминокислоты быть в структурированном участке (α -спирали или β -тяже) или неструктурированном участке [113, 156]. В свою очередь, сравнение предсказанной структурированности отдельных участков белковой глобулы с экспериментально определёнными кристаллическими структурами, а точнее – расхождение теоретических предсказаний с разрешенной структурой, может нести дополнительную информацию о стабильности укладки белка [157]. Было предположено, что с помощью такого подхода можно определить «слабые места» в структуре белка, где при воздействии внешних факторов с большей вероятностью может начаться процесс разворачивания белковой глобулы.

Веб-сервис PONDR VLXT [159], предсказывающий на основе известных характеристик определенных групп аминокислотных остатков их вероятность находиться на упорядоченном или неупорядоченном участке, был использован для анализа бактериальных люцифераз *P. leiognathi* и *V. harveyi*. Анализ показал, что α -субъединицы двух люцифераз обладают близкими свойствами: около 22% аминокислотных остатков были оценены как способные находиться на разупорядоченных участках (PONDR score > 0,5), они оказались расположены в пределах восьми сегментов субъединицы (Рисунок 3.4, А). Для обеих люцифераз была предсказана значительная степень разупорядоченности С-концевого домена (аминокислотные остатки α 300-355), что отличается от состояния, полученного в кристалле [134]. То есть эта часть α -субъединицы люциферазы вероятно наименее структурно

стабильна. Такое заключение согласуется с экспериментальными исследованиями, показавшими, что с именно с нарушения структуры С-концевого домена α -субъединицы люциферазы *V. harveyi* начинается разворачивание этого белка химическими денатурирующими агентами [160].

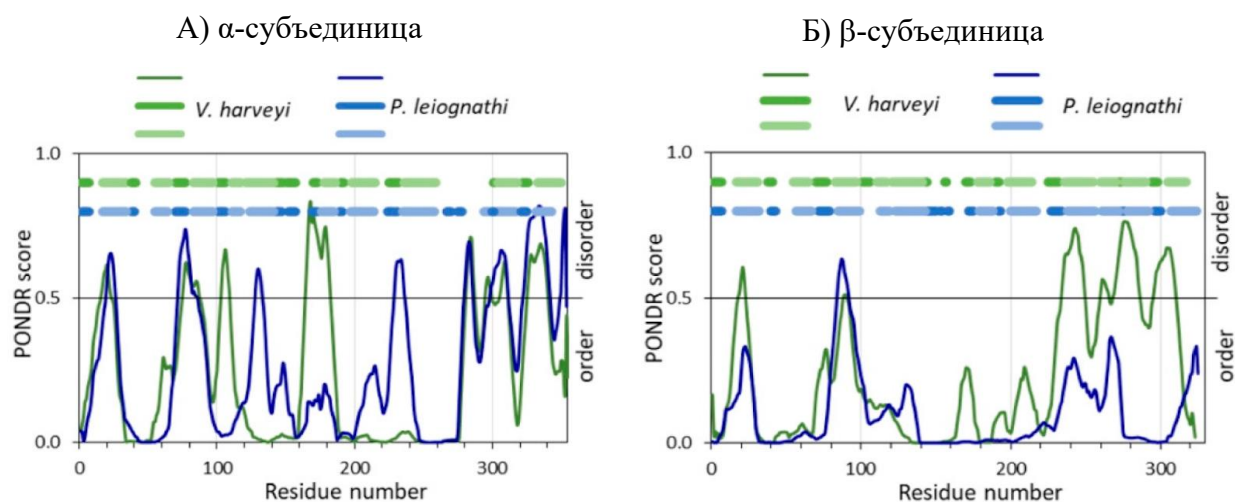


Рисунок 3.4 – Предрасположенность аминокислотных остатков α -субъединицы (А) и β -субъединицы (Б) люцифераз *V. harveyi* (зеленый) и *P. leiognathi* (синий) к локализации на упорядоченных и разупорядоченных элементах вторичной структуры согласно оценкам PONDR FIT [159]. Горизонтальные толстые линии обозначают положение аминокислот, формирующих α -спирали (более светлые толстые линии) или β -тяжи (более темные толстые линии), согласно трехмерной структуре белка. Участки вторичной структуры были определены с помощью UCSF Chimera [141, 160]

Оценки предрасположенности к упорядоченности участков β -субъединиц двух люцифераз различаются: у люциферазы *V. harveyi* неупорядоченность прогнозируется для ~20% аминокислотных остатков, а у люциферазы *P. leiognathi* – только для ~3% (Рисунок 3.4, Б). Наибольшее различие для исследуемых люцифераз наблюдаются на участке β 227–325. Согласно расшифрованной кристаллической структуре люциферазы *V. harveyi* на данном участке присутствуют как α -спирали, так и β -тяжи [134]. Такое противоречие может означать, что этот участок структуры взаимодействует с остальной, более жестко упакованной, частью β -субъединицы, что обеспечивает правильную укладку трехмерной структуры.

Большая склонность к разупорядоченности С-конца β -субъединицы люциферазы *V. harveyi*, чем белка *P. leiognathi* согласуется экспериментальными исследованиями [159], показавшими методом кругового дихроизма, что под действием мочевины заключительная стадия разворачивания люциферазы *V. harveyi* проходит при меньших концентрациях

денатурирующего агента, чем белка *P. leiognathi*. Считается, что на этой стадии как раз происходит разворачивание отдельных субъединиц бактериальных люцифераз [161], и при этом люцифераза *V. harveyi* демонстрирует меньшую стабильность, чем белок *P. leiognathi*.

3.3 Структура бактериальных люцифераз в растворах с осмолитами

Влияние осмолитов разного молекулярного размера на общие структурные характеристики люцифераз

Анализ параметров среднеквадратичного отклонения (RMSD), радиуса инерции (R_g) и площади поверхности, доступной растворителю, (SASA) по полученным молекулярно-динамическим траекториям позволяет быстро оценить изменение конформационного состояния белка в ходе моделирования относительно его трехмерной структуры в кристалле. В большинстве исследований расчет RMSD является первым этапом анализа полученных МД-траекторий. Этот параметр показывает, было ли выбранное время вычисления молекулярной динамики достаточным для релаксации трехмерной структуры белка. Выход на плато параметра RMSD свидетельствует о достижении белковой глобулой некоторого энергетического минимума, что означает, что дальнейшее увеличение времени моделирования не приведет к значительным изменениям в структуре. Расчет среднеквадратичного отклонения производится относительно кристаллической структуры, и величина RMSD позволяет оценить, насколько структура белковой глобулы изменилась в ходе молекулярной динамики относительно начальной.

На рисунке 3.5 А, Б представлено изменение RMSD C_α -атомов бактериальных люцифераз в водном окружении и в присутствии различных осмолитов (40 %) во время моделирования молекулярной динамики. Стоит отметить, что во всех средах для люциферазы *P. leiognathi* наблюдалось большее значение RMSD, чем для белка *V. harveyi*, что возможно связано с тем, что трехмерная структура люциферазы *P. leiognathi* была смоделирована по гомологии. Начиная примерно с 80 нс, среднеквадратичное отклонение для практически для всех в целом не изменяется. В присутствии этиленгликоля наблюдается больший рост RMSD для обоих исследуемых ферментов, по сравнению с остальными осмолитами.

Усредненные за последние 20 нс значения RMSD представлены на рисунке 3.5, В. Интересно, что, хотя для всех моделируемых сред RMSD меньше для люциферазы *V. harveyi*, чем для белка *P. leiognathi*, влияние присутствия одного и того же осмолита на исследуемые ферменты проявляется сходным образом. В частности, этиленгликоль заметно увеличивает RMSD обоих люцифераз по сравнению с водным окружением.

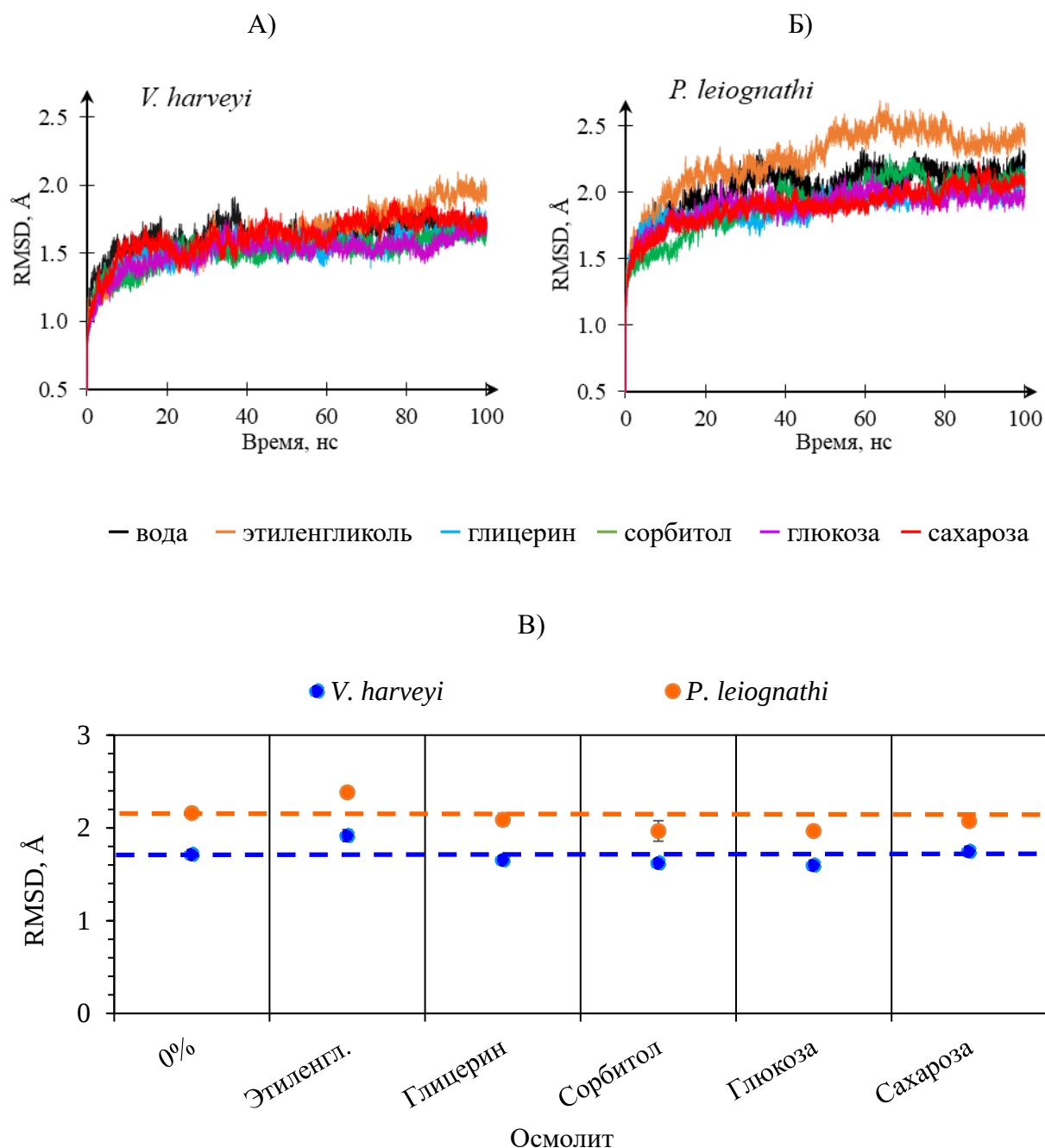


Рисунок 3.5 – Среднеквадратичное отклонение (RMSD) C α -атомов люциферазы *V. harveyi* (А) и *P. leiognathi* (Б) в воде и смесях с осмолитами (40 %) в ходе динамики. Усредненное значение (точки) и стандартное отклонение (планки погрешностей) за последние 20 нс молекулярной динамики (В).

Параметры радиуса инерции (R_g) и площади поверхности, доступной растворителю, (SASA) также были определены для люцифераз *V. harveyi* и *P. leiognathi*. Значения R_g и SASA анализировали для последних 20 нс МД-траекторий (Рисунки 3.6 и 3.7), так как параметр RMSD показал достаточную стабилизацию структуры на этом интервале.

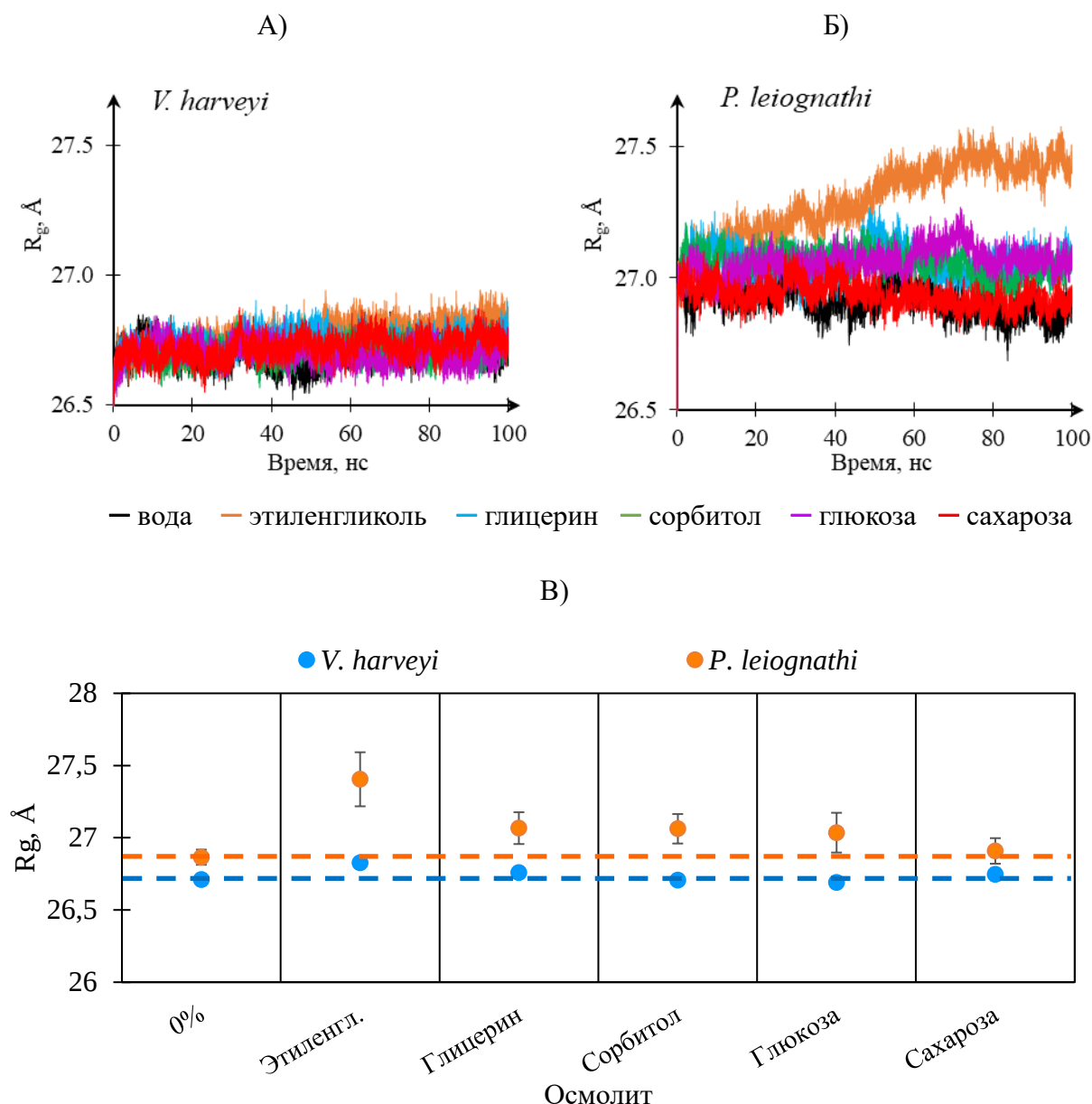


Рисунок 3.6 – Радиус инерции (R_g) всех атомов люциферазы *V. harveyi* (А) и *P. leiognathi* (Б) в воде и смесях с осмолитами (40%) в ходе молекулярной динамики. Усредненное значение (точки) и стандартное отклонение (планки погрешностей) за последние 20 нс молекулярной динамики (В).

Параметры R_g и SASA указывают на большую компактность структуры люциферазы *V. harveyi*: во всех исследованных системах значения этих параметров у белка *P. leiognathi* достоверно выше (Рисунки 3.6, В и 3.7, В). Специфическое влияние этиленгликоля на люциферазы выглядит более ярко при анализе этих параметров. Рост R_g и SASA в присутствии этиленгликоля по сравнению с другими осмолитами говорит о вероятном нарушении нативной структуры белковой глобулы. Возможно, это связано с тем, что этиленгликоль предпочитает для взаимодействия гидрофобные участки на поверхности белка [162], что в свою

очередь, приводит к ее дестабилизации. Этот эффект выражен гораздо более сильно для люциферазы *P. leiognathi*.

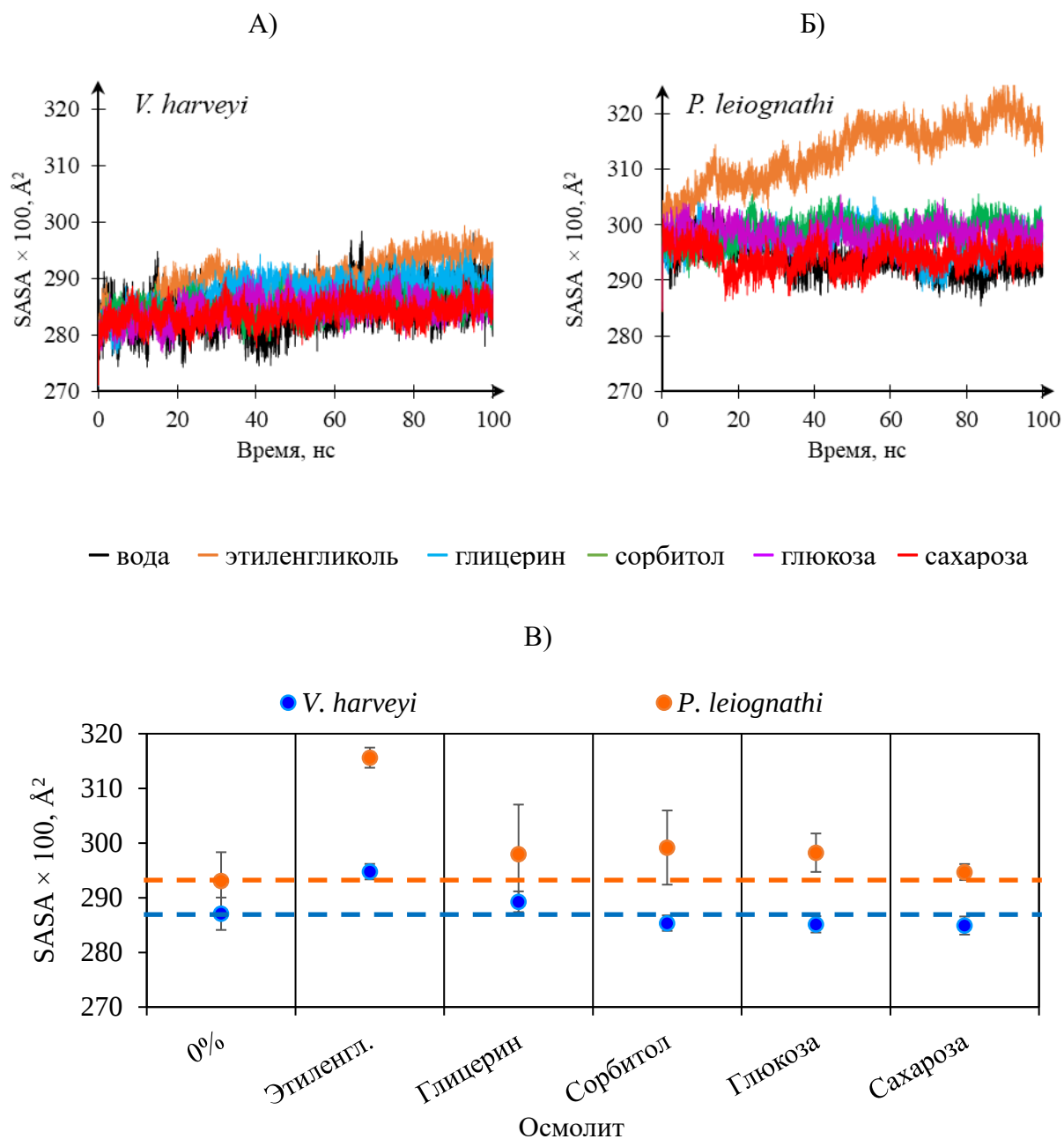


Рисунок 3.7 – Площадь поверхности, доступной растворителю, (SASA) люциферазы *V. harveyi* (А) и *P. leiognathi* (Б) в воде и смесях с осмолитами (40%) в ходе молекулярной динамики. Усредненное значение (точки) и стандартное отклонение (планки погрешностей) за последние 20 нс молекулярной динамики (В).

Структурные характеристики люцифераз при вариации концентрации осмолитов

Для двух осмолитов – с самым маленьким молекулярным размером (глицерин) и самым большим (сахароза) были проведены расчеты молекулярно-динамических траекторий люцифераз при различных концентрациях: 5, 10, 20, 30 и 40 вес.%. Этиленгликоль не рассматривался в данном случае из-за его специфического влияния.

Аналогично представленным выше данным были определены структурные параметры RMSD, R_g и SASA бактериальных люцифераз в зависимости от концентрации осмолитов (Рисунок 3.8).

Получено, что значение равновесного RMSD для обеих люцифераз в присутствии соразтворителей меняется незначительно по сравнению с водным окружением и в ходе моделирования отклоняется от среднего значения на 5-10% (Рисунок 3.8, А). Параметры R_g и SASA также заметно не изменялись при вариации концентрации глицерина и сахарозы (Рисунок 3.8, Б, В). Таким образом, не было выявлено особых концентрационных эффектов глицерина или сахарозы на компактность глобулы исследованных белков и на общую площадь их поверхности.

Следует отметить, что увеличение значений R_g и SASA в присутствии осмолитов по сравнению с водным окружением было получено в работах и других авторов. Так, Лерехт с соавторами провели МД-расчеты для лизоцима в окружении мальтозы, сахарозы и трегалозы [66]. Результаты показали незначительное снижение RMSD и рост R_g и SASA с увеличением концентрации соразтворителя. Отсутствие ожидаемого увеличения компактности белковой глобулы как основного механизма стабилизации её структуры авторы объяснили тем, что такой механизм наблюдается только при неблагоприятных условиях, таких как, например, высокая температура. При этом в стандартных условиях конфигурация остова фермента изменяется незначительно. Увеличение радиуса инерции и SASA авторы связали со специфичными взаимодействиями молекул осмолитов с аминокислотными остатками на поверхности белка: поворот боковых цепей вызывает смещение центра масс каждого остатка, что приводит к росту рассчитываемого R_g и увеличению доступности поверхности фермента для молекул окружения (SASA).

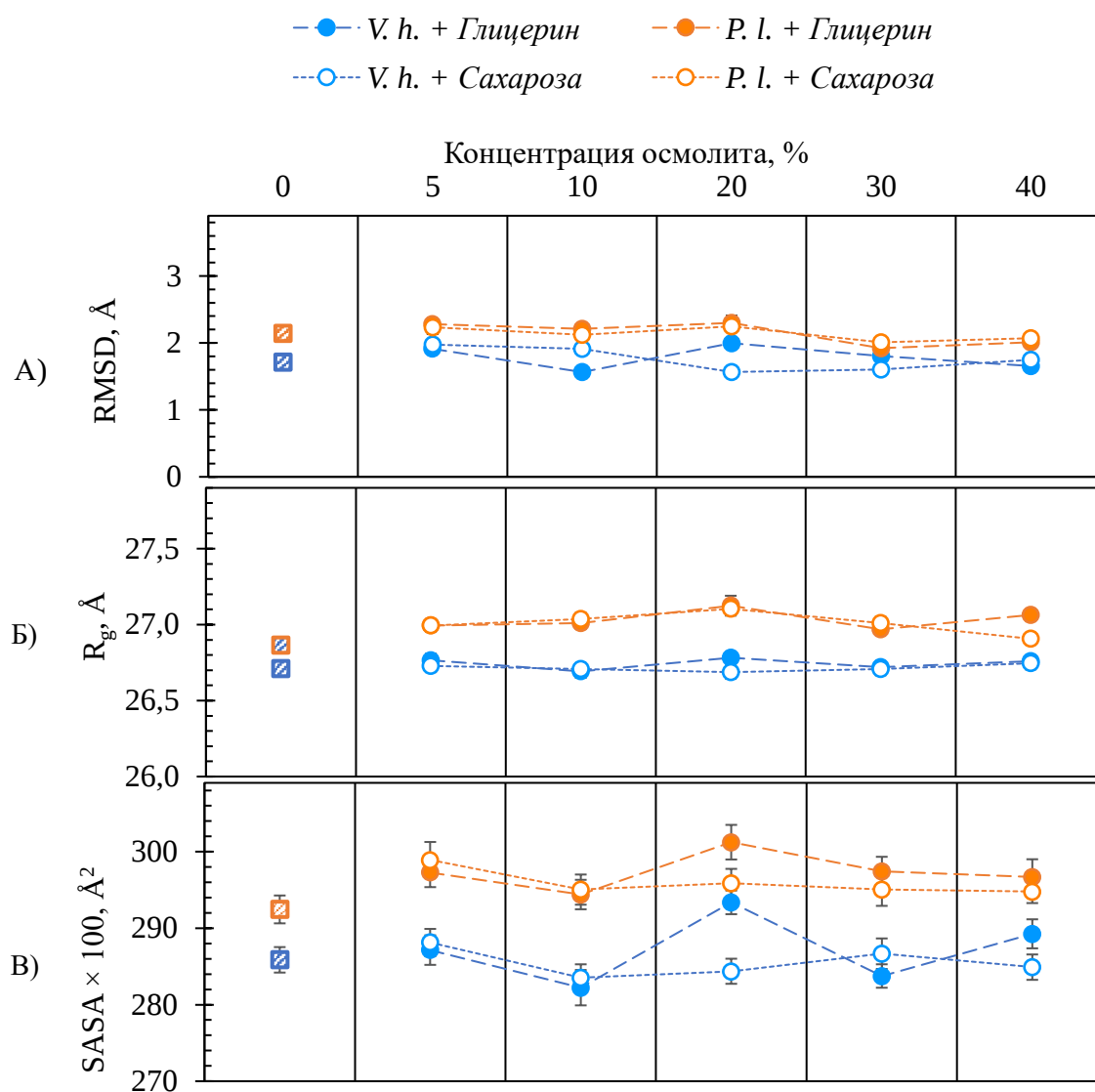


Рисунок 3.8 – Структурные параметры бактериальных люцифераз *V. harveyi* (синие маркеры) и *P. leiognathi* (оранжевые маркеры) для водного окружения (квадратные маркеры) и в присутствии различных концентраций глицерина (заполненные круглые маркеры) или сахарозы (пустые круглые маркеры): (А) среднеквадратичное отклонение (RMSD) C_{α} -атомов; (Б) радиус инерции (R_g) на основе всех атомов; (В) площадь поверхности белка, доступная растворителю (SASA). Параметры рассчитаны для последних 20 нс молекулярно-динамических траекторий. Линии проведены для удобства восприятия.

3.4 Распределение молекул воды и осмолитов около поверхности бактериальных люцифераз

Функция распределения минимального расстояния от поверхности люцифераз до молекул воды и осмолитов

Функция распределения минимального расстояния (MDDF – minimum distance distribution function) позволяет описать организацию молекул растворителя вблизи поверхности белка (см. раздел 1.3.6). Она основана на расчете расстояний между ближайшими атомами белка и растворителя. Такой подход позволяет анализировать организацию молекул окружения с учетом сложной формы как молекул растворителя, так и самой белковой глобулы. При расчете зависимости MDDF для молекул воды от расстояния до поверхности белка как правило получают кривую с несколькими пиками. Первый пик, при $1,8 \text{ \AA}$, соответствует оптимальному расстоянию образования водородной связи между молекулами воды и поверхностью белка, а также наименее возможному расстоянию между водородами аминокислот и растворителя. Вторым, находящийся примерно на расстоянии $2,7 \text{ \AA}$, обозначает границы второго гидратного слоя фермента и минимально возможное расстояние, на котором может быть обнаружен атом кислорода растворителя [163]. Полученное распределение MDDF для молекул воды относительно поверхности двух люцифераз (g_{pw}), представленное на рисунке 3.9, соответствует типичной картине.

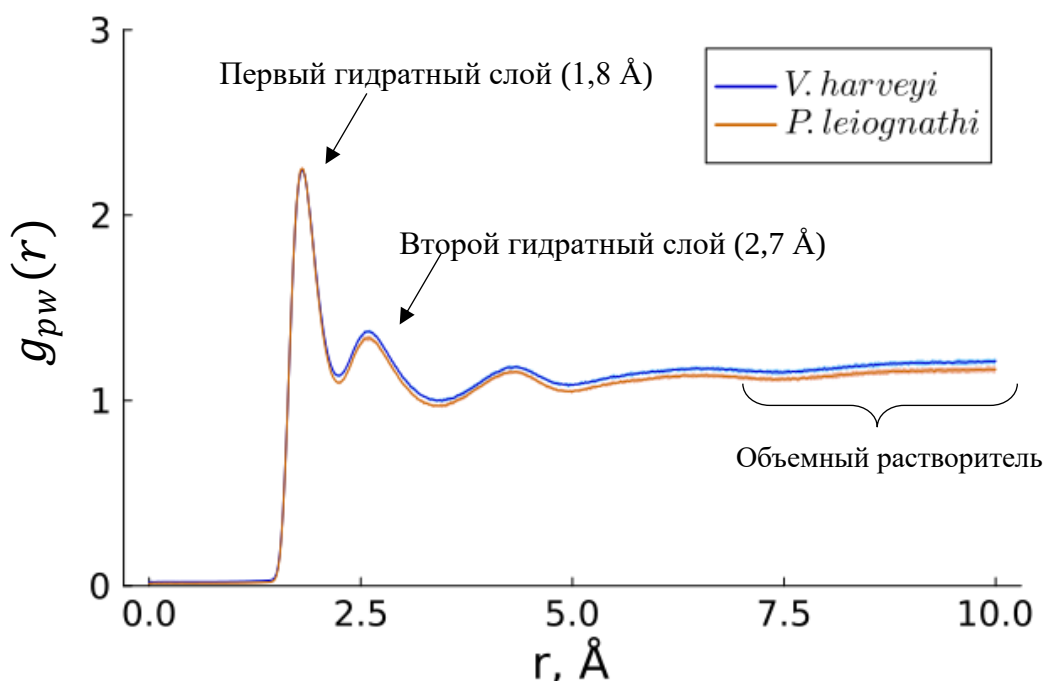


Рисунок 3.9 – Функция распределения минимального расстояния для молекул воды на разном расстоянии r от поверхности бактериальных люцифераз *V. harveyi* и *P. leiognathi*. Рассчитано на основе молекулярно-динамических траекторий белков в окружении молекул воды.

С увеличением расстояния от поверхности фермента значение MDDF стремится к единице, что является характеристикой объемного растворителя, где влияние белка на

организацию молекул практически отсутствует. Как видно из рисунка 3.9, функции g_{pw} имеют схожие профили для двух люцифераз. Это говорит о том, что поверхности исследуемых белков облают близкими конформационными и электростатическими характеристиками.

Аналогичный анализ был проведен для МД-траекторий люцифераз в модельных боксах с осмолитами (40 вес.%). Результаты представлены на рисунке 3.10. Видно, что профили функции распределения минимального расстояния молекул осмолитов (g_{pc}) и воды (g_{pw}) не зависят от типа люциферазы и осмолита: первый максимум всегда находится на расстоянии 1,8 Å. Получено, что присутствие осмолитов увеличивает число молекул воды в первом гидратном слое (g_{pw}) относительного общего количества частиц в системе по сравнению только с водным окружением, и этот эффект не зависит от типа люциферазы и осмолита (Рисунок 3.10, В, Г).

Однако профиль MDDF для молекул осмолитов (g_{pc}) различается для каждого из рассмотренных веществ: молекулы сахарозы имеют наибольшее значение MDDF на расстоянии 1,8 Å от поверхности белков, далее идут сорбитол и глюкоза, имеющие практически идентичные профили распределения, а глицерин обладает наименьшим значением максимума. g_{pc} этиленгликоля наиболее отличается от всех остальных осмолитов, она имеет второй максимум на расстоянии 2,5 Å. Интересно, что такое различие максимумов пиков g_{pc} коррелирует с молекулярным размером осмолитов (см. раздел 2.2). Возможно, это связано с тем, что молекулы осмолитов с большим размеров имеют большее количество ОН-групп и, соответственно, могут более эффективно образовывать водородные связи в первом гидратном слое белка.

Поэтому таких молекул больше на поверхности белка относительно их общего количества (g_{pc} при 1,8 Å), чем осмолитов меньшего размера. Этиленгликоль, не смотря на свой малый размер, вероятно из-за своих гидрофобных свойств не может эффективно образовывать водородные связи. Возможно, этим обусловлено наблюдаемое для него соотношение пиков MDDF в первом и втором гидратном слое белка (1,8 Å и 2.7 Å).

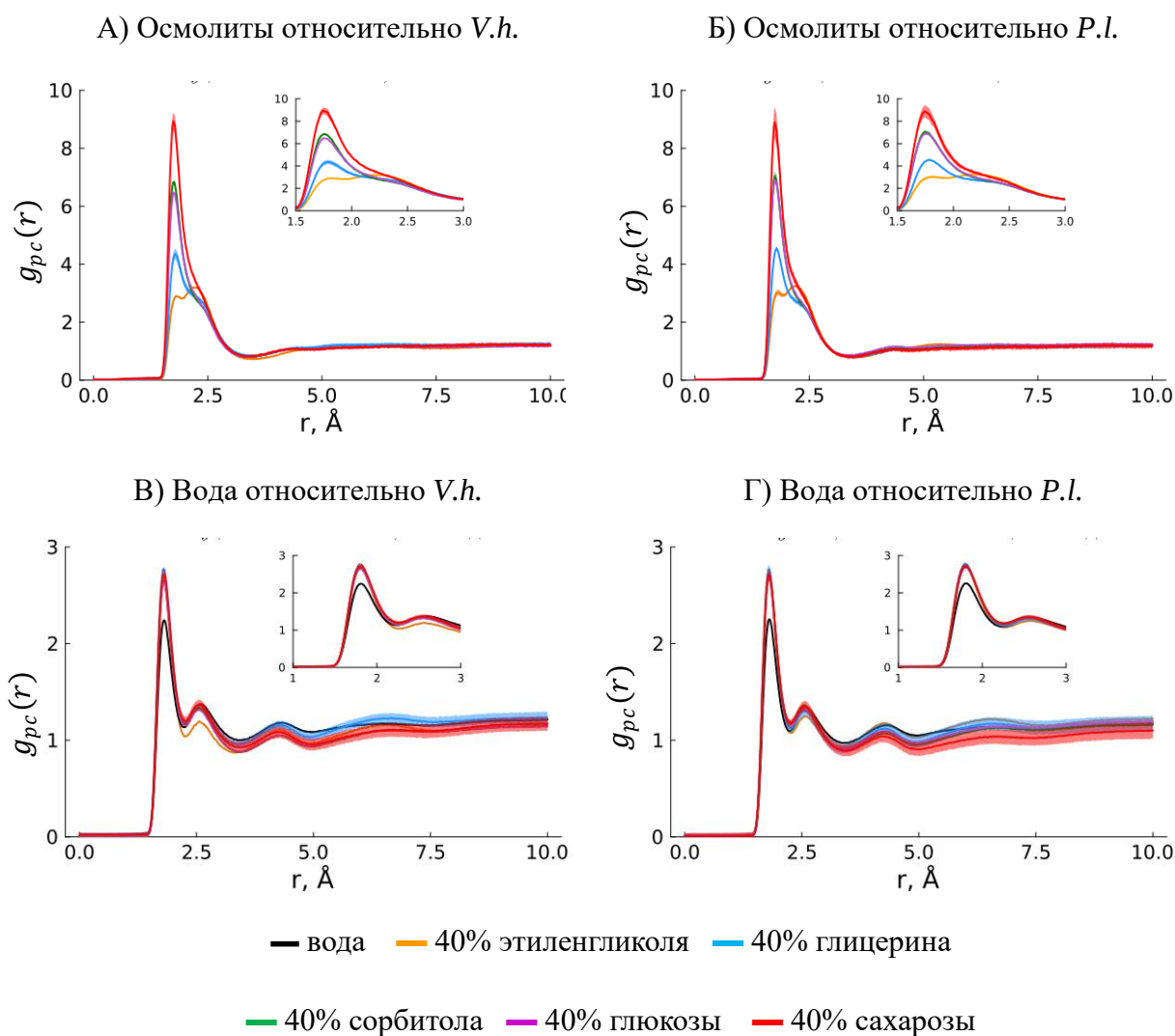


Рисунок 3.10 – Функция распределения минимального расстояния от молекул осмолитов (А, Б) и воды (В, Г) до поверхности бактериальных люцифераз *V. harveyi* (А, В) и *P. leiognathi* (Б, Г). Рассчитано на основе МД-траекторий белков в окружении смеси молекул воды и осмолитов (40%). На врезках показаны пики функции на расстоянии до 3 Å в более крупном масштабе. Стандартное отклонение отображено полупрозрачным коридором.

Зависимость организации молекул осмолитов в гидратной оболочке бактериальных люцифераз от их концентрации

Для двух осмолитов – с самым маленьким молекулярным размером (глицерин) и самым большим (сахароза) – были проведены расчеты MDDF при различных концентрациях: 5, 10, 20, 30 и 40 вес.%. Результаты представлены на рисунках 3.11 и 3.12. Видно, что в целом формы кривых схожи и не зависят ни от природы осмолита, ни от типа люциферазы. Как и в исключительно водном окружении (Рисунок 3.9), пики функции наблюдаются на

расстояниях 1,8 Å и 2,7 Å от поверхности белка, что говорит о большом количестве водородных связей между ферментом и молекулами окружения.

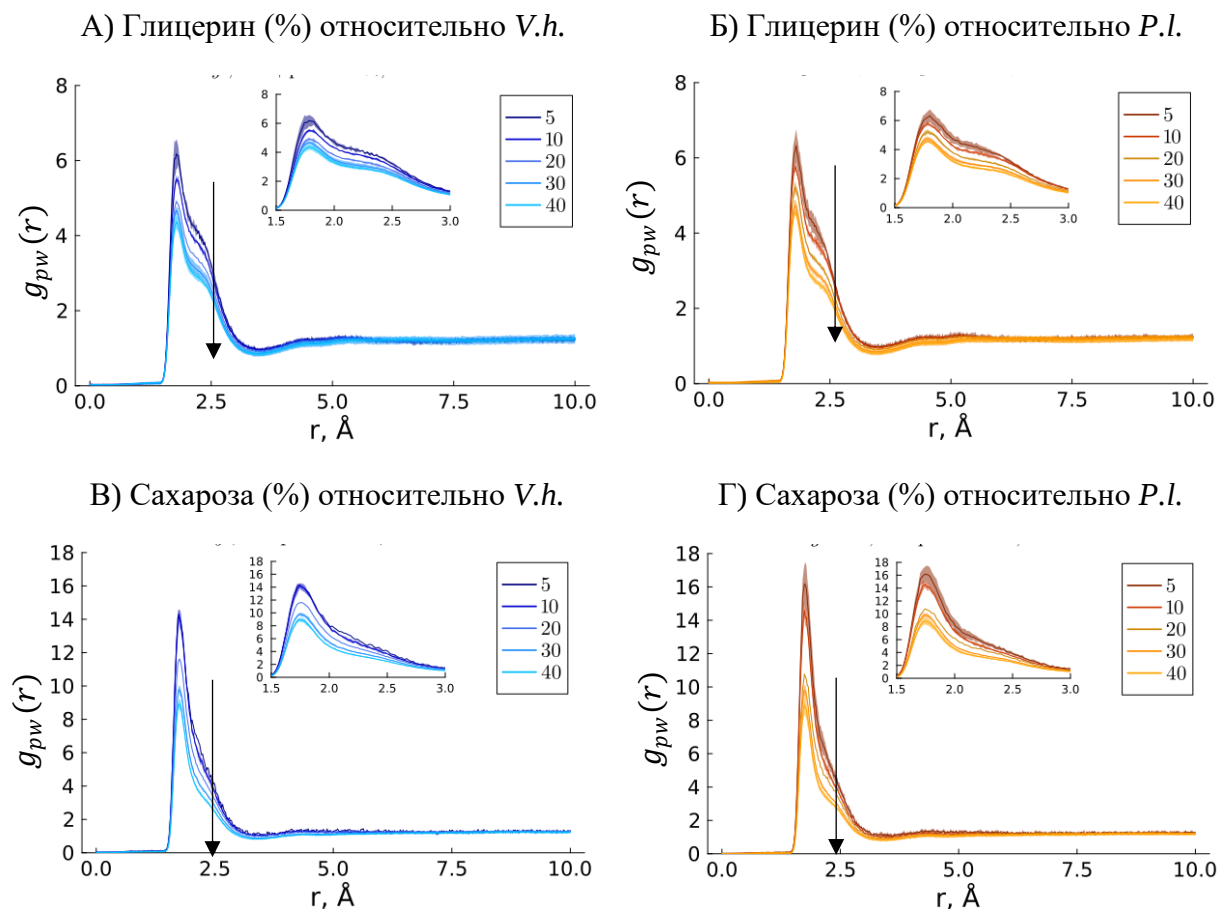


Рисунок 3.11 – Функция распределения минимального расстояния от молекул осмолитов до поверхности бактериальных люцифераз *V. harveyi* (А, В) и *P. leiognathi* (Б, Г) при вариации концентрации глицерина (А, Б) и сахарозы (В, Г). Стрелкой показано направление увеличения концентрации осмолита. Рассчитано на основе молекулярно-динамических траекторий белков в окружении смеси молекул воды и глицерина/сахарозы с концентрациями 5, 10, 20, 30 и 40 вес.%. На врезках показаны пики функции на расстоянии до 3 Å в более крупном масштабе. Стандартное отклонение отображено полупрозрачным коридором.

Распределение сахарозы при содержании этого осмолита 5 и 10 вес.% демонстрирует некоторые различия для двух люцифераз. Значения функции g_{pw} вблизи поверхности белка выше для люциферазы *P. leiognathi*, чем для *V. harveyi* (Рисунок 3.11, В, Г). То есть при малых концентрациях сахарозы проявляется большая склонность с ней взаимодействовать поверхности люциферазы *P. leiognathi*, чем второго белка. Все это указывает на то, что поверхности изучаемых люцифераз имеют структурные особенности, определяющие разные значения MDDF для сахарозы.

Осмолиты образуют водородные связи с поверхностью белка, но с ростом их концентрации величина локальной плотности в первом гидратном слое снижается (Рисунок 3.11). Это указывает на то, что наиболее предпочтительные для взаимодействия поверхностные области ферментов постепенно заполняются. В целом, для молекул сахарозы значения g_{pw} выше, чем для глицерина (ср. рисунки 3.11 А, Б и В, Г).

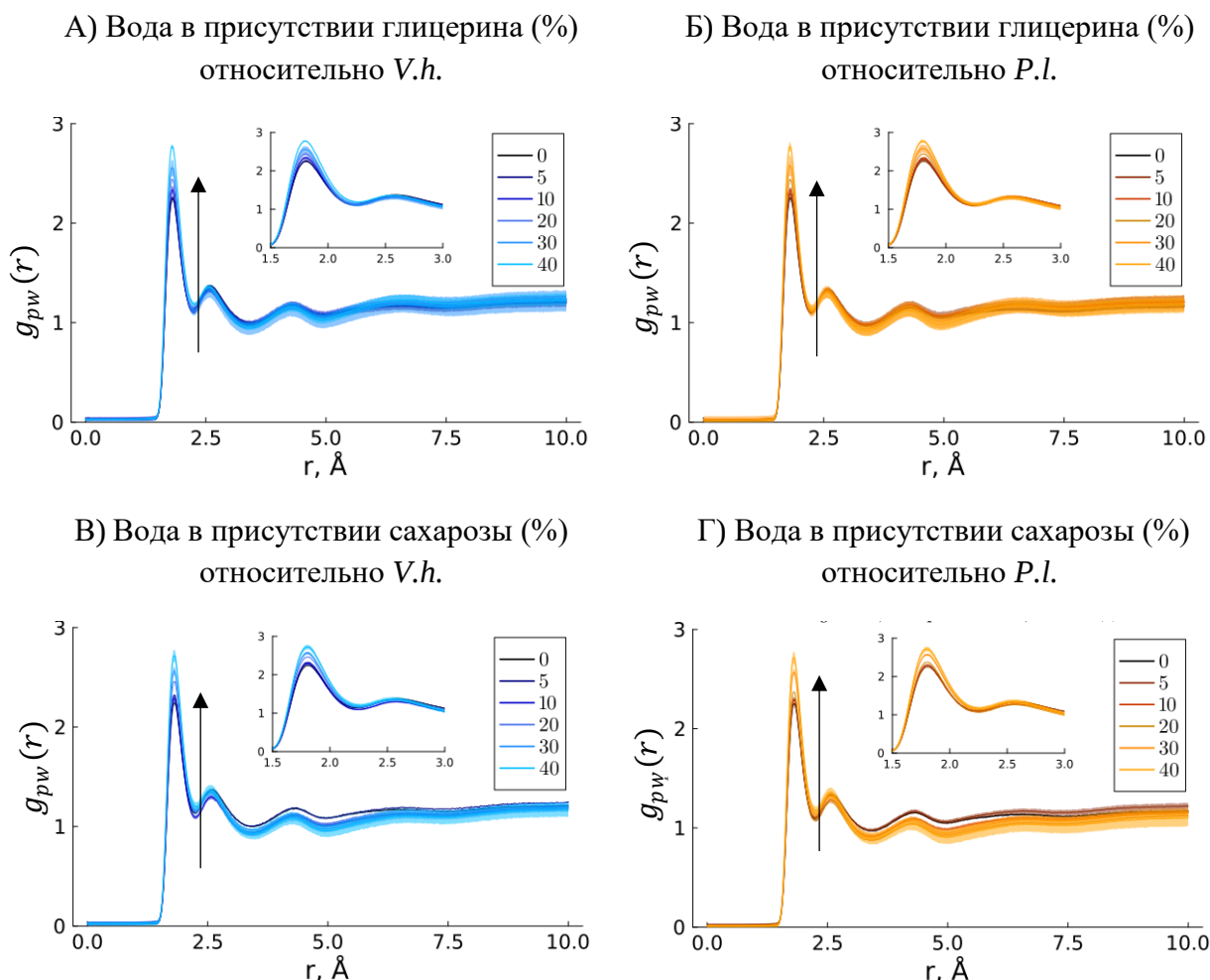


Рисунок 3.12 – Функция распределения минимального расстояния от молекул воды до поверхности бактериальных люцифераз *V. harveyi* (А, В) и *P. leiognathi* (Б, Г) при вариации концентрации глицерина (А, Б) и сахарозы (В, Г). Стрелкой показано направление увеличения концентрации осмолита. Рассчитано на основе МД-траекторий белков в окружении смеси молекул воды и глицерина/сахарозы с концентрациями 5, 10, 20, 30 и 40 вес.%. На врезках показаны пики функции на расстоянии до 3 Å в более крупном масштабе. Стандартное отклонение отображено полупрозрачным коридором.

Плотность распределения на расстоянии 1,8 Å больше, чем в объемном растворителе, для молекул глицерина в 4-6 раз, а для сахарозы – в 9-18 раз. Возможно, это связано с тем, что количество молекул сахарозы в моделируемых системах примерно в 4 раза меньше,

чем молекул глицерина. Следовательно, *большой* процент от общего числа ее молекул связывается на поверхности белков. В свою очередь, рост g_{pw} с увеличением концентрации глицерина/сахарозы может быть связан с тем, что количество молекул воды в объемном растворителе падает, что приводит к усугублению разницы между поверхностью белка и средой.

Считается, что присутствие осмолитов должно приводить к вытеснению молекул воды из второго гидратного слоя белка [164]. Следовательно, с ростом концентрации глицерина/сахарозы величина g_{pw} должна снижаться на расстоянии 2,7 Å от поверхности фермента. Но как видно на рисунке 3.12, значения g_{pw} практически неразличимы при любых концентрациях осмолитов, включая 0% (модель только водного окружения). Вероятно, такой эффект возникает из-за наличия на поверхности люцифераз большого количества областей, которые доступны только для определённого типа молекул (либо воды, либо осмолита).

Распределение молекул воды и осмолитов относительно гидрофобной и гидрофильной поверхности бактериальных люцифераз

Функция распределения MDDF может быть использована для оценки организации молекул растворителя на гидрофильных и гидрофобных участках поверхности белка. В этом случае рассчитывается плотность у поверхности заряженных и нейтральных аминокислотных остатков, соответственно. Результаты таких расчетов для двух бактериальных люцифераз приведены на рисунках 3.13 и 3.14.

Видно, что в максимум функции при 1,8 Å главный вклад вносят молекулы осмолитов или воды, которые преимущественно находятся около заряженных аминокислотных остатков и образуют сильные водородные связи. В тоже время основной вклад во второй гидратный слой (в MDDF при 2,7 Å) вносят взаимодействия с гидрофобными участками на поверхности белка.

Для 5%-ой концентрации сахарозы (Рисунок 3.13, Б) отчётливо видно, что плотность осмолита около заряженной поверхности выше для люциферазы *P. leiognathi*, чем для белка *V. harveyi*. Для других модельных сред значительных различий функций g_{pc} и g_{pw} двух люцифераз не наблюдается. Все это говорит о возможном эффекте малых концентраций сахарозы на люциферазу *P. leiognathi*. Такой механизм влияния был продемонстрирован на примере ацетилхолинэстеразы мышей в работе [64].

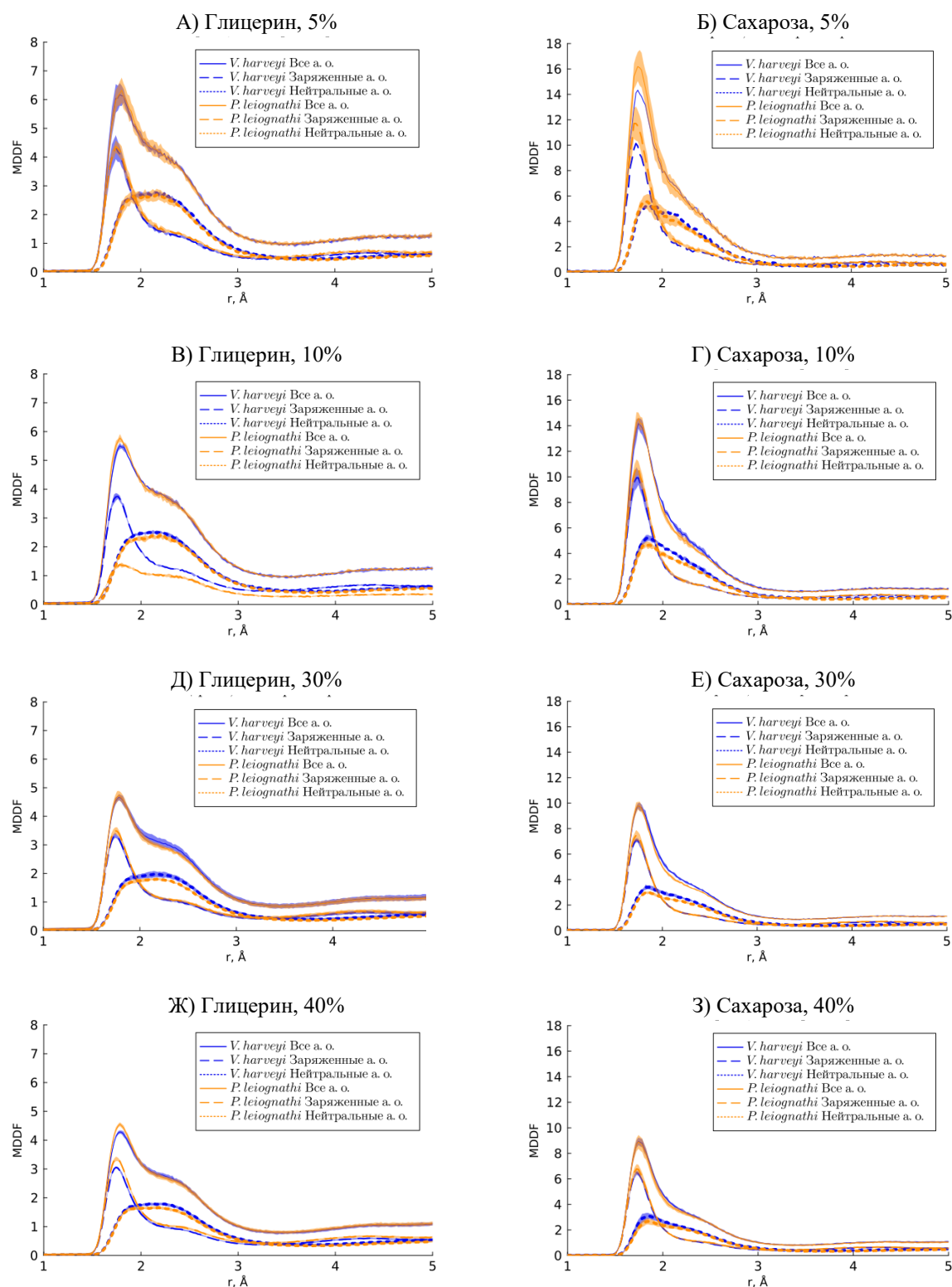


Рисунок 3.13 – Функция распределения минимального расстояния для молекул глицерина (А, В, Д, Ж) и сахарозы (Б, Г, Е, З) относительно нейтральных аминокислотных остатков (пунктирные линии) и заряженных аминокислотных остатков (штриховые линии) поверхности бактериальных люцифераз *V. harveyi* (синие линии) и *P. leiognathi* (оранжевые линии). Сплошные линии показывают суммарную функцию. Стандартное отклонение отображено полупрозрачным коридором.

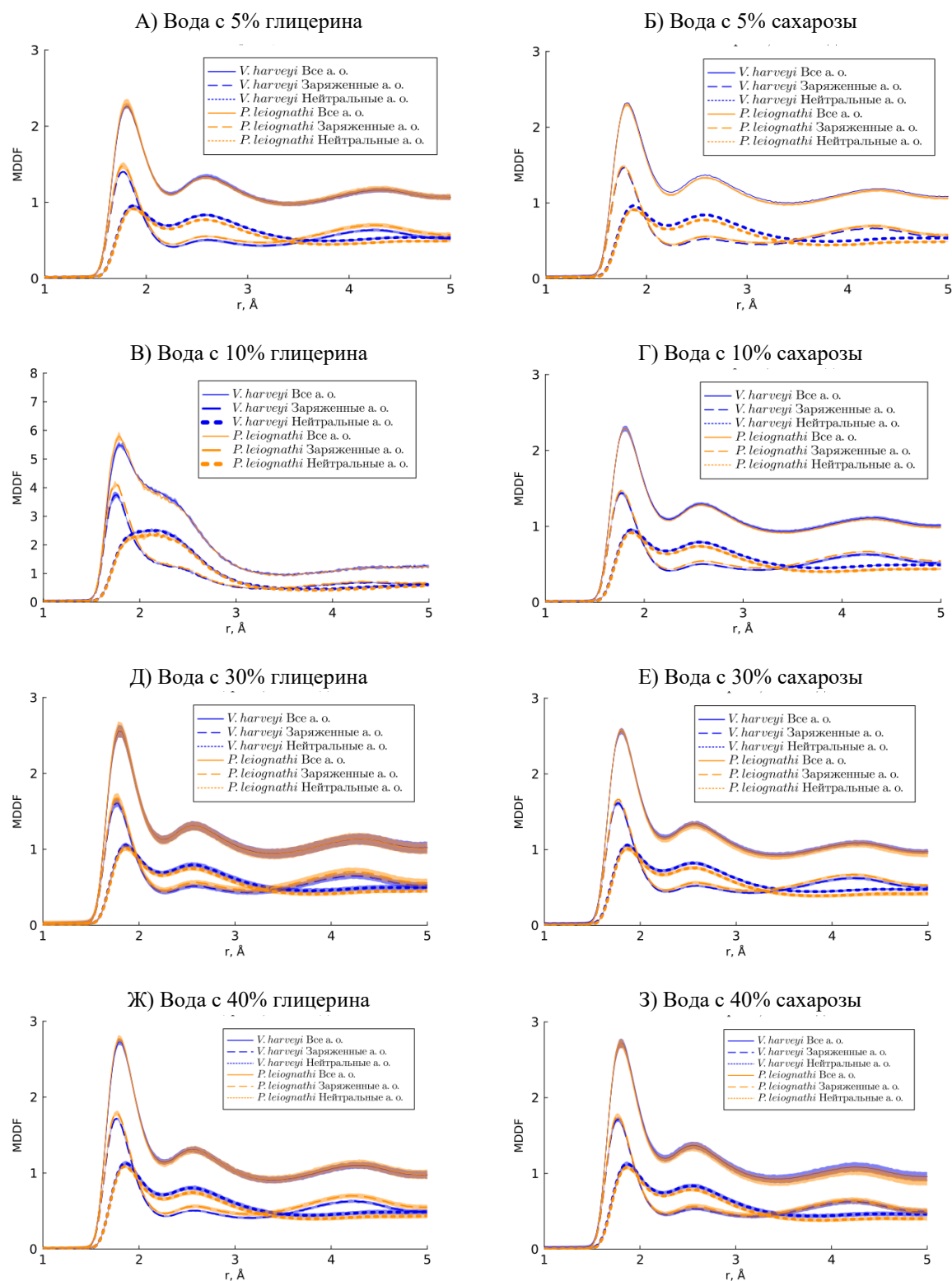


Рисунок 3.14 – Функция распределения минимального расстояния (MDDF) для молекул воды в присутствии разных концентраций глицерина (А, В, Д, Ж) и сахарозы (Б, Г, Е, З), относительно нейтральных аминокислотных остатков (пунктирные линии) и заряженных аминокислотных остатков (штриховые линии) поверхности бактериальных люцифераз *V. harveyi* (синие линии) и *P. leiognathi* (оранжевые линии). Сплошные линии показывают суммарную функцию. Стандартное отклонение отображено полупрозрачным коридором.

Также заметным различием между двумя осмолитами можно назвать профиль функции распределения около незаряженной поверхности белков (Рисунок 3.13, сравниваем пунктирные линии на А и Б, В и Г, Д и Е, Ж и З): если для глицерина эти распределения имеют два примерно равнозначных пика при 1,8 и 2,7 Å, то для сахарозы первый пик более амплитудный, чем второй. Это говорит о том, что сахароза, не смотря на большой молекулярный размер, может подойти на более близкое расстояние к незаряженной поверхности люциферазы, чем глицерин.

Эти особенности вероятно связаны с наличием у молекулы сахарозы неполярных групп и общей гибкостью молекулярной структуры по сравнению с молекулой глицерина. Также с ростом концентрации осмолитов меняется профиль MDDF для воды около незаряженной поверхности (пик при 1,8 Å становится выше, чем пик при 2,7 Å). Это может говорить о том, что либо молекулы воды покидают незаряженную поверхность на близком расстоянии (например, уступая место осмолитам), либо занимают больше мест связывания на более дальнем расстоянии (например, вытесняя оттуда осмолиты).

Коэффициенты предпочтительного взаимодействия молекул воды и осмолитов с ферментами

На основе функций распределения минимального расстояния (MDDF) можно рассчитать коэффициенты предпочтительного взаимодействия с поверхностью белка для молекул осмолитов (Γ_{pc}) и воды (Γ_{pw}) (см. подробности в разделе 1.3.6 литературного обзора). Положительные значения этих коэффициентов говорят о предпочтительном взаимодействии белка с молекулой (о плотности на поверхности белка большей, чем в объемном растворителе), в то время как отрицательные значения говорят о вытеснении молекул с поверхности под действием каких-то факторов [77]. Коэффициенты Γ_{pc} и Γ_{pw} для моделей с разными осмолитами в максимальной концентрации приведены на рисунке 3.15.

Данные, представленные на рисунке 3.15, свидетельствуют о том, что для большинства соразтворителей наблюдается преимущественное связывание их молекул с поверхностью люциферазы ($\Gamma_{pc} > 0$). Молекулы воды исключаются с поверхности ($\Gamma_{pw} < 0$). С другой стороны, в присутствии этиленгликоля и глицерина значения коэффициента преимущественно связывания воды близки к нулю. Это может говорить о некотором переходном состоянии, между предпочтительной гидратацией белка и исключением молекул воды с поверхности белка [29]. Однако стоит заметить, что данный вывод противоречит классическому представлению об организации молекул окружения ферментов в присутствии осмолитов. Считается, что осмопротекторы должны исключаться с поверхности белка с

одновременным повышением уровня его гидратации [29, 92]. Тем не менее, в разделе 1.2.1 обзора литературы представлены примеры, подтверждающие, что взаимодействия в паре фермент-осмолит могут быть уникальны.

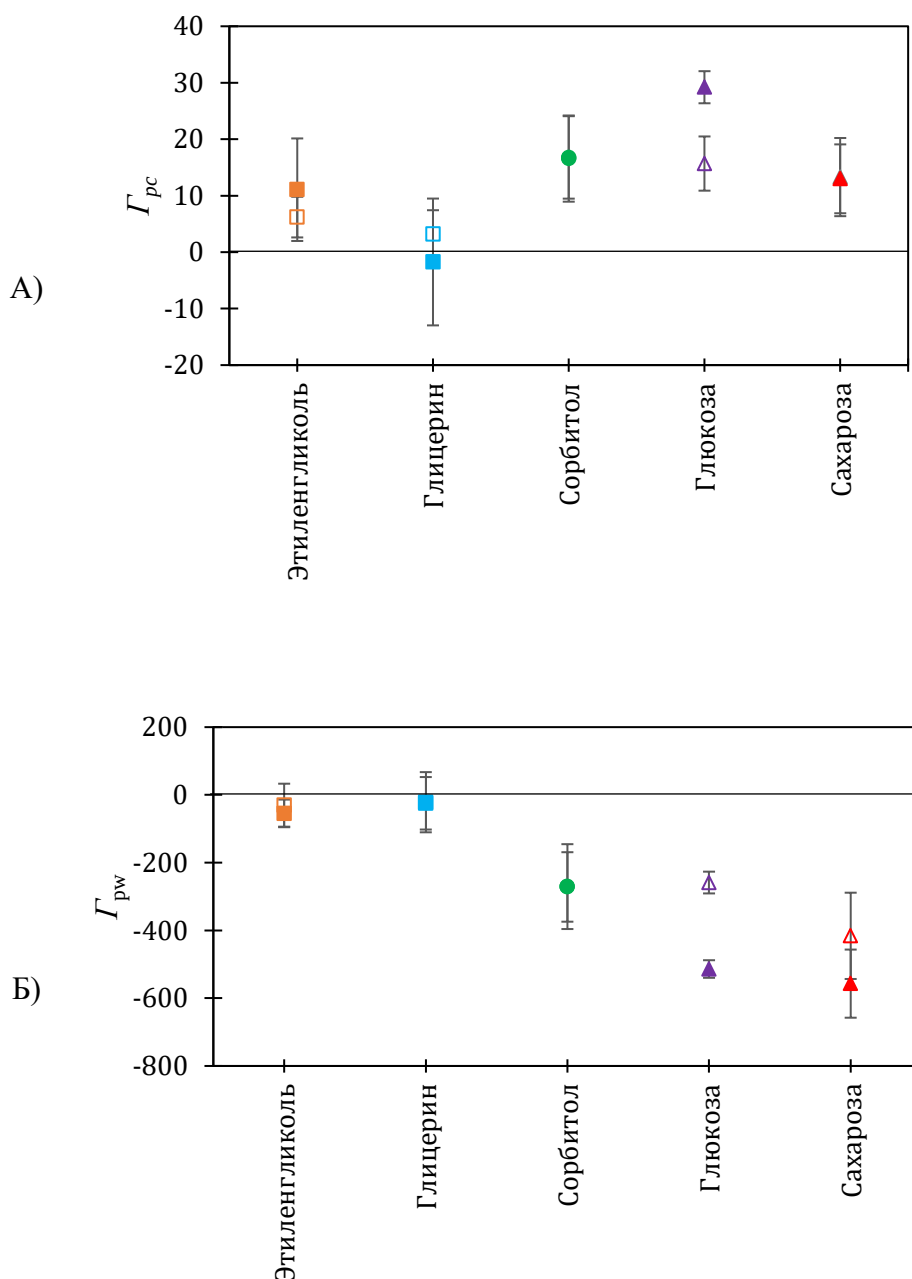


Рисунок 3.15 – Коэффициенты предпочтительного взаимодействия люциферазы *V. harveyi* (не закрашенные маркеры) и *P. leiognathi* (закрашенные маркеры) с осмолитами, Γ_{pc} (А) и водой, Γ_{pw} (Б). Рассчитано на основе молекулярно-динамических траекторий белка в окружении смеси молекул воды с этиленгликолем (40%), глицерином (40%), сорбитолом (40%), глюкозой (40%) и сахарозой (40%).

Для прояснения данного вопроса были проанализированы концентрационные зависимости коэффициентов взаимодействия двух люцифераз для моделей с глицерином и сахарозой (Рисунок 3.16).

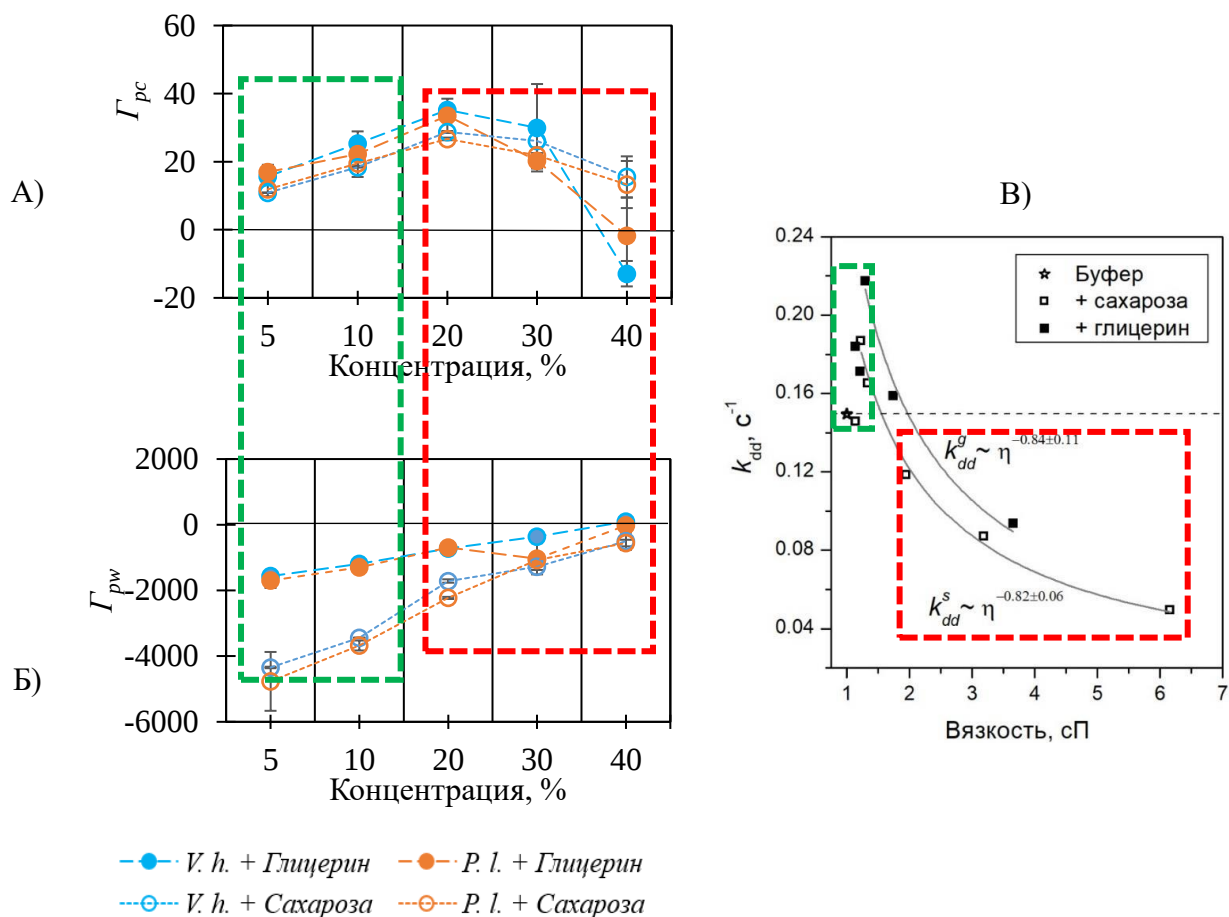


Рисунок 3.16 – Коэффициенты предпочтительного взаимодействия люцифераз *V. harveyi* (голубые маркеры) и *P. leiognathi* (оранжевые маркеры) с молекулами осмолитов (А) и воды (Б) при различных концентрациях глицерина (заполненные маркеры) или сахарозы (пустые маркеры). (С) Экспериментально определённая зависимость скорости распада Интермедиата II от вязкости среды в присутствии глицерина и сахарозы в реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*. Взято из [155]. Цветные рамки выделяют области концентраций осмолитов со сходными механизмами влияния на белок.

Было получено, что везде, за исключением системы с 40%-ной концентрацией глицерина, $\Gamma_{pc} > 0$, что означает, что молекулы сахарозы и глицерина предпочтительно связываются с поверхностью белков. В свою очередь, $\Gamma_{pw} < 0$ говорит об исключении молекул воды из первого гидратного слоя ферментов, что наиболее ярко проявляется при самой низкой концентрации осмолитов (5%), и становится менее и менее выражено с ростом содержания

глицерина и сахарозы (Рисунок 3.16, Б). Увеличение коэффициента Γ_{pc} показывает, что с ростом концентрации осмолитов все большее количество молекул глицерина и сахарозы связываются на поверхности исследуемых люцифераз (Рисунок 3.16, А). Однако такая тенденции наблюдается только до 20%-й концентрации осмолитов.

С дальнейшим увеличением содержания осмолитов в среде значения Γ_{pc} снижаются. Это может быть связано с наполненностью сайтов связывания на поверхности люцифераз, доступных для молекул глицерина и сахарозы. Снижение Γ_{pc} и рост Γ_{pw} означают, что с дальнейшим увеличением концентрации осмолитов их молекулы будут предпочтительно исключаться с поверхности белка. Такая смена механизмов хорошо видна в модели с 40%-м содержанием глицерина: для обеих люцифераз $\Gamma_{pc} \leq 0$. Возможно, это говорит о переходном состоянии между связыванием/исключением глицерина с поверхности люцифераз. Для сахарозы тенденция схожая, но при 40% всё ещё наблюдается предпочтительное взаимодействие этого осмолита с поверхностью ферментов ($\Gamma_{pc} > 0$).

Зависимость предпочтительного связывания/исключения осмопротекторов от концентрации была показана также и для других белков. В недавнем исследовании Миотто с соавторами была промоделирована молекулярная динамика ферментов лизоцима и β -лактоглобулина в окружении ряда осмопротекторов различной концентрации (4, 17, 37 вес.%) [165]. Было показано, что глицерин при всех концентрациях, а сорбитол при 4 и 17%, предпочтительно взаимодействуют с поверхностью изученных ферментов. Для двух дисахаридов, сахарозы и трегалозы, наблюдалась различная картина. Так, сахароза при концентрации 4% предпочтительно связывалась с поверхностью белков, а с дальнейшим ростом концентрации исключалась с поверхности. Такая же тенденция наблюдалась для β -лактоглобулина в окружении трегалозы. Но для лизоцима коэффициент предпочтительного взаимодействия для любых концентраций трегалозы был мало отличим от нуля. Был сделан вывод, что классическому механизму предпочтительного связывания подчиняются только молекулы мочевины.

Данные результаты еще раз подчеркивают важность рассмотрения механизма предпочтительного взаимодействия/исключения в паре парой белок-осмолит в каждом отдельном случае. Результаты этого исследования и работы других авторов демонстрируют зависимость эффектов не только от свойств молекул осмолитов и индивидуальных особенностей белка, но и от концентрации осмолита.

Полученные в рамках данного диссертационного исследования концентрационные зависимости (Рисунок 3.16, А, Б) были соотнесены с эффектами сред с глицерином и сахарозой на кинетику реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi* (Рисунок 3.16, В) [155]. Эффект малых концентраций осмолитов на скорость распада ключевого

пероксифлавинового интермедиата реакции, а именно ускорение этого распада, может быть связано с эффектом преферативного взаимодействия фермента с осмолитами и вытеснение молекул воды с поверхности белка (зелёные рамки на рисунке 3.16). При более высоких концентрациях количество воды на поверхности люциферазы становится больше и в эффекте на распад интермедиата начинают доминировать другие механизмы, а именно диффузионное ограничение (красные рамки на рисунке 3.16).

Интересно, что схожие результаты для некоторых осмолитов, в частности высоких концентраций глицерина и сахарозы, были получены в работе [165]. Авторы утверждают, что с ростом концентрации осмолитов увеличивается также их кластеризация в растворе. Чем больше кластер, тем больше вероятность его исключения из первого гидратного слоя белка. Следовательно, существует положительная корреляция между кластеризацией осмолита и степенью его предпочтительного исключения. Возможно, это как раз объясняет полученные результаты, представленные на рисунке 3.16.

Авторы также отмечают, что морфология кластеров, образованных исключенными осмолитами, по-видимому, зависит от характеристик конкретного белка. Это интересный факт, так как по своей сути исключенный кластер и белковая глобула прямо не взаимодействуют между собой. Авторы выдвигают гипотезу, что взаимодействие пары белок-кластер определяется характеристиками первого гидратного слоя фермента. В свою очередь, на первый план выходят такие параметры как форма белковой глобулы и свойства ее поверхности [165].

3.5 Влияние осмолитов на активный центр бактериальных люцифераз

Определение полости активного центра в структуре бактериальных люцифераз

Для анализа влияния осмолитов на полость активного центра ферментов сначала требовалось определить область пространственной структуры люцифераз, где располагается эта полость, что было сделано с помощью веб-сервиса CASTp [151]. В результате анализа для двух бактериальных люцифераз было получено описание полости, где находятся центры связывания флавина и альдегида (Рисунок 3.17). Это, в частности, подтверждается сопоставлением с известной кристаллической структурой люциферазы *V. harveyi* в комплексе с FMN (PDB ID 3FGC) [139].

Стоит отметить, что несмотря на высокую гомологичность и использование кристаллической структуры люциферазы *V. harveyi* в качестве шаблона для реконструкции структуры люциферазы *P. leiognathi*, исследуемые белки характеризуются активными центрами разных размеров. Так, каталитическая область люциферазы *V. harveyi* больше, она

сформирована 43-мя аминокислотными остатками, ее объем составляет около $412,4 \text{ \AA}^3$, а площадь поверхности – $551,5 \text{ \AA}^2$. В свою очередь, активный центр реконструированной структуры *P. leiognathi* образован 35-ю аминокислотными остатками, с объемом около $340,6 \text{ \AA}^3$ и площадью около $436,3 \text{ \AA}^2$, что примерно на 20% меньше, чем у гомолога. Список аминокислотных остатков, формирующих полость активного центра люцифераз, представлен в таблице 3.3. Не смотря на большое количество консервативных для всего семейства бактериальных люцифераз остатков, идентичность списков для двух исследованных ферментов составляет около 66%. Тем не менее, в связывании флавина участвуют преимущественно одни и те же аминокислотные остатки, за исключением позиций 6, 75, 106 и 173. В тоже время, гидрофобную область для связывания альдегида двух люцифераз формируют идентичные аминокислотные остатки.

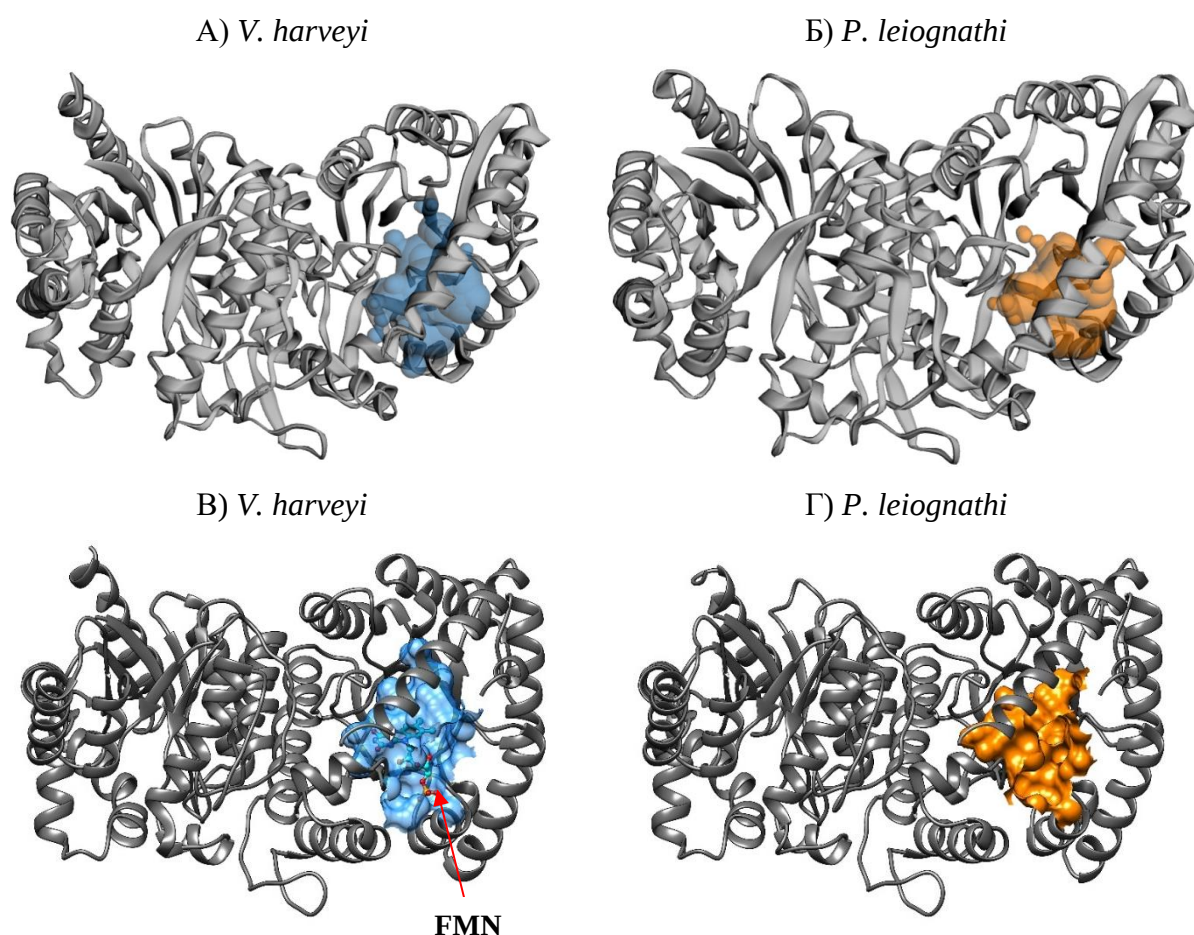


Рисунок 3.17 – Полость, где располагается активный центр (А, Б) и поверхность каталитического кармана (В, Г) люцифераз *V. harveyi* (А, В) и *P. leiognathi* (Б, Г), определенные с помощью CASTp. Положение FMN на (В) показано на основе кристаллической структуры (PDB ID 3FGC).

Таблица 3.3 – Аминокислотные остатки α -субъединицы бактериальных люцифераз, формирующих полость активного центра, согласно анализу CASTp

Номер в последовательности [#]	Аминокислотный остаток	
	<i>V. harveyi</i> ^{\$}	<i>P. leiognathi</i>
6	Phe	Ile
7	Leu	–
8	Leu	Phe
40	Trp	Trp
41	–	Thr
42*	Leu	Leu
43*	Glu	Glu
44*	His	His
45	–	His
49*	Phe	Phe
74	Ala	Met
75	Ala	Gly
77*	Val	Val
106	Cys	Val
107*	Arg	Arg
108*	Gly	Gly
109*	Leu	Leu
110*	Tyr	Tyr
112*	Lys	–
113*	Asp	Asp
114*	Phe	–
121*	Met	–
124*	Ser	–
128*	Met	Trp
170	–	Met
173	Val	Thr
174*	Ala	Ala
175*	Glu	Glu
176*	Ser	Ser
179*	Thr	Thr

Окончание Таблицы 3.3

191	Ile	Val
192*	Leu	Leu
193*	Ser	Ser
194*	Trp	Trp
195*	Ile	Ile
227	Ser	Thr
228	Tyr	–
229*	Ile	–
246*	Phe	–
247*	Leu	Leu
250*	Trp	Trp
251*	Tyr	Tyr
254*	Tyr	Tyr
292	Ile	Leu
326*	Gly	–
328*	Glu	–
329*	Ala	–

#согласно нумерации последовательности люциферазы *V. harveyi*; *аминокислотные остатки, консервативные для 21-й последовательности бактериальных люцифераз [166]; § цветом выделены сайты связывания флавина (синий) и альдегида (желтый), Leu109 участвует в обоих сайтах (зелёный) [13, 131].

Рассмотрение архитектуры полости активного центра люциферазы *V. harveyi*, представленной на рисунке 3.18, показывает, что аминокислотные остатки, расположенные в последовательности α -субъединицы в позициях 6, 7, 8, 40, 41, 42, 43 44 45, 74 и 75, формируют дно полости. В свою очередь, аминокислотные остатки в позициях 173, 174, 175, 176, 179 расположены у входа в активный центр.

Интерес также представляет следующая группа аминокислотных остатков люциферазы *V. harveyi*: α Phe6, α Leu8, α Trp194, α Ile195, α Tyr228, α Ile229, α Phe246, α Gly326, α Glu328, α Ala329. Согласно веб-сервису CASTp, эти остатки участвуют в образовании дополнительного каталитического кармана в глубине белковой глобулы, в то время как для люциферазы *P. leiognathi* такая полость не была определена (Рисунок 3.19, А).

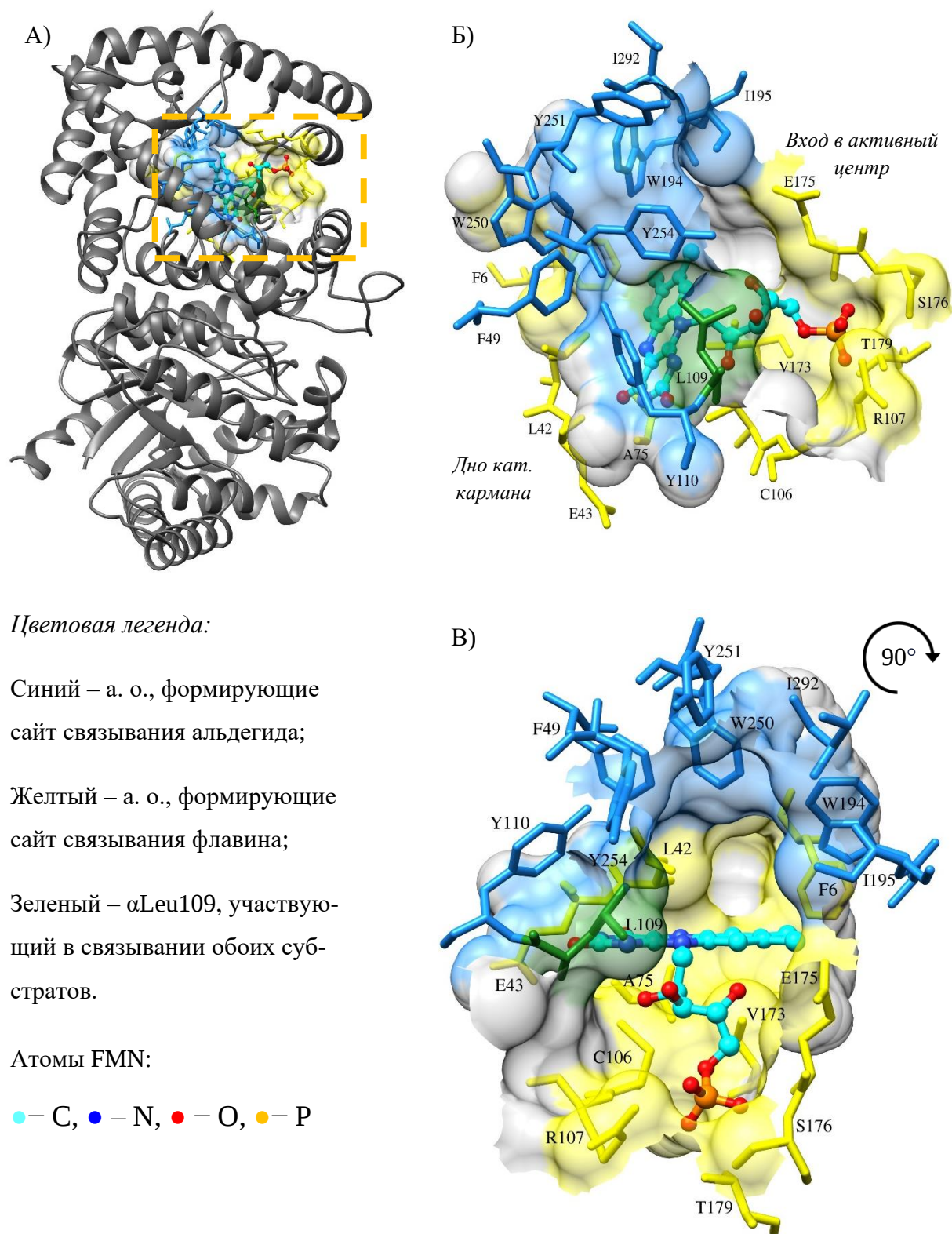
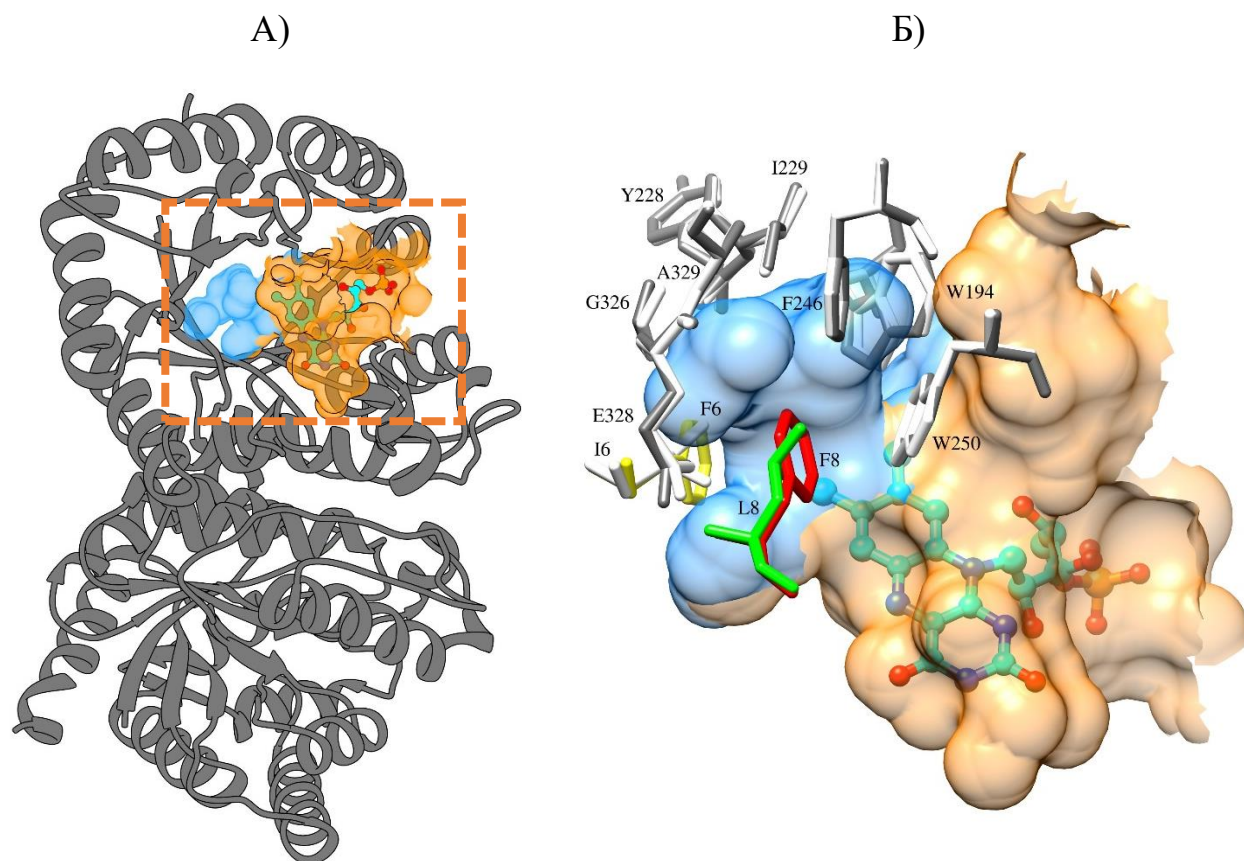


Рисунок 3.18 – Кристаллическая структура люциферазы *V. harveyi* (ID PDB: 3FGC) в комплексе с FMN (представление СРК) (А) и поверхность полости активного центра, выделенной рамкой, в двух проекциях (Б, В). Цветами показаны аминокислотные остатки, участвующие в связывании флавина (желтый) и альдегида (голубой). Участок мобильной петли (α 262-291) не отображен.



Атомы FMN: ● — C, ● — N, ● — O, ● — P

Рисунок 3.19 – (А) Пространственное выравнивание полостей активного центра бактериальных люцифераз *V. harveyi* (синий) и *P. leiognathi* (оранжевый), определенных с помощью веб-сервиса CASTp, относительно кристаллической структуры люциферазы *V. harveyi* (ID PDB: 3FGC) в комплексе с FMN (представление СРК). (Б) Полости активного центра крупным планом (выделенная рамкой область): аминокислотные остатки, формирующие дополнительную полость люциферазы *V. harveyi*, показаны в виде стержневой модели темным 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.

Стоит отметить, что выравнивание остатков двух исследуемых люцифераз только под этими номерами показало, что они практически идентичны. Исключение составляет α Phe/Пe6 α Leu/Phe8 α Tyr/Phe228 для люцифераз *V. harveyi*/*P. leiognathi* соответственно. Эта дополнительная область может объяснить разницу объемов активных центров двух ферментов. Ключевая разница заключается в положении фенилаланинов исследуемых люцифераз, участвующих в формировании активного центра. α Phe6 люциферазы *V. harveyi*

играет важную роль в стабилизации флавина [131, 138]. У фермента *P. leiognathi* в этом положении располагается α Phe6, который, как оказалось, не участвует в формировании каталитического кармана. В тоже время фенилаланин, выполняющий, как предполагается, аналогичную роль в структуре люциферазы *P. leiognathi* – это α Phe8. На рисунке 3.19 видно, что α Phe8 расположен ближе к входу в активный центр люциферазы *P. leiognathi* и к боковым цепям α Trp194 и α Trp250, чем α Phe6 у фермента *V. harveyi*. Следовательно, бензольное кольцо α Phe8 может создавать стерические ограничения, делающие невозможным образования дополнительной полости, имеющейся у люциферазы *V. harveyi*. Последняя имеет в том же положении α Leu8, чья боковая цепь меньше бензольного кольца фенилаланина и не мешает образованию дополнительной полости в глубине белковой глобулы.

Изменение объёма активного центра люцифераз в присутствии осмолитов

После определение полости активного центра люцифераз было проанализировано влияние на него разных осмолитов. На основе МД-траекторий люцифераз в модельных системах в окружении воды и 40% осмолитов был рассчитан объем активного центра ферментов в течение последних 20 нс. Результаты показаны на рисунке 3.20. Получено, что разница в размерах каталитических полостей двух люцифераз, обнаруженная для начальных структур, также сохраняется и в процессе моделирования молекулярной динамики: у люциферазы *V. harveyi* объем активного центра при одинаковых условиях практически всегда больше, чем для *P. leiognathi* (Рисунок 3.20). Исключение составляет глицерин, в присутствии которого значения этого параметра для обеих люцифераз практически одинаковы. Из общих тенденций можно отметить, что в присутствии этиленгликоля, глицерина и сорбитола объем активного центра увеличивается на $\geq 20\%$, в то время как сахара не оказывают значительного влияния по сравнению с водным окружением. Интересно, что этиленгликоль и сорбитол увеличивают размер каталитической полости *V. harveyi* на 30%, когда как для *P. leiognathi* этот эффект не так ярко выражен. Данный эффект не согласовывается полностью с изменением параметров RMSD, R_g , SASA (Рисунки 3.5-3.7), характеризующих общую стабильность белковой глобулы. Во-первых, присутствие этиленгликоля сильнее дестабилизирует структуру люциферазы *P. leiognathi*, чем *V. harveyi*, а по объёму видна обратная тенденция. Во-вторых, для сорбитола не было установлено влияния на конформацию ферментов.

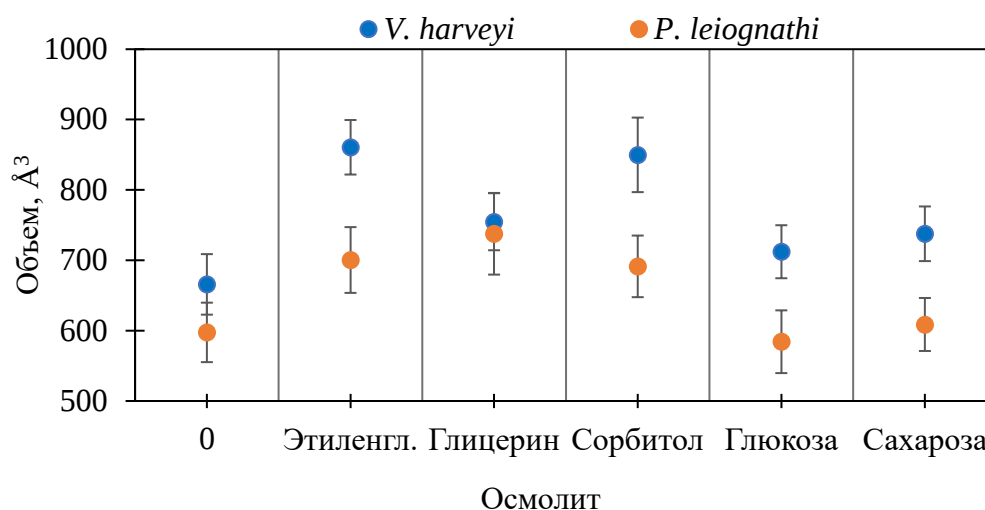


Рисунок 3.20 – Объём активного центра бактериальных люцифераз *V. harveyi* (синие маркеры) и *P. leiognathi* (оранжевые маркеры) в воде (0) и смесях с осмолитами (40%) в ходе динамики. Показаны средние значения (точки) и стандартное отклонение (планки погрешностей) за последние 20 нс молекулярной динамики.

Расчет количества молекул осмолитов/воды в активном центре фермента позволяет оценить то, насколько изменение объема каталитической полости повлияло на её доступность для молекул окружения. По результатам расчетов, представленных на рисунке 3.21 видно, что этиленгликоль, обладая наименьшим молекулярным размером, больше всего проникает в активный центр обеих люцифераз. Одна молекула этого сорастворителя состоит из 10-ти атомов. Следовательно, около 5-ти молекул этиленгликоля постоянно находятся в активном центре люциферазы *P. leiognathi* и около 4-х – *V. harveyi*. Для остальных осмолитов количество атомов и молекул в каталитической полости меньше и коррелирует с их молекулярным размером, но не с изменением объёма полости. Моделирование показало, что атомы сахарозы не имеют доступа к активному центру обеих люцифераз.

Аналогичный расчёт был проведен и для молекул воды (Рисунок 3.22). В отсутствие осмолитов количество молекул воды в каталитической полости двух люцифераз практически идентичное. Этиленгликоль и глицерин, обладая малым молекулярным размером, вытесняют молекулы воды из активного центра люцифераз, снижая их количество примерно в два раза по сравнению с моделью исключительно водного окружения. Зафиксированное увеличение объема каталитической полости в присутствии сорбитола (Рисунок 3.20) не привело к росту числа молекул этого осмолита в ней (Рисунок 3.21), но зато увеличило количество молекул воды, приблизив его к значению в буфере (Рисунок 3.22). Глюкоза, плохо проникая в активный центр, тем не менее вытесняет оттуда часть молекул воды. Для сахарозы получено, что она из-за стерических ограничений не может проникать в область

связывания субстратов, но вместе с тем не препятствует свободному проникновению воды. В целом, стоит отметить, что если доступ осмолитов к активному центру фермента зависит от типа люциферазы, то на количество молекул воды в полости прежде всего влияет тип осмолита, а не фермента. Кроме того, присутствие осмолитов может приводить к локальным конформационным перестройкам и появлению новых полостей в структуре белка. Это влечёт увлечение объема активного центра, куда может проникать еще большее количество молекул воды, но который не доступен для молекул осмолитов из-за стерических ограничений.

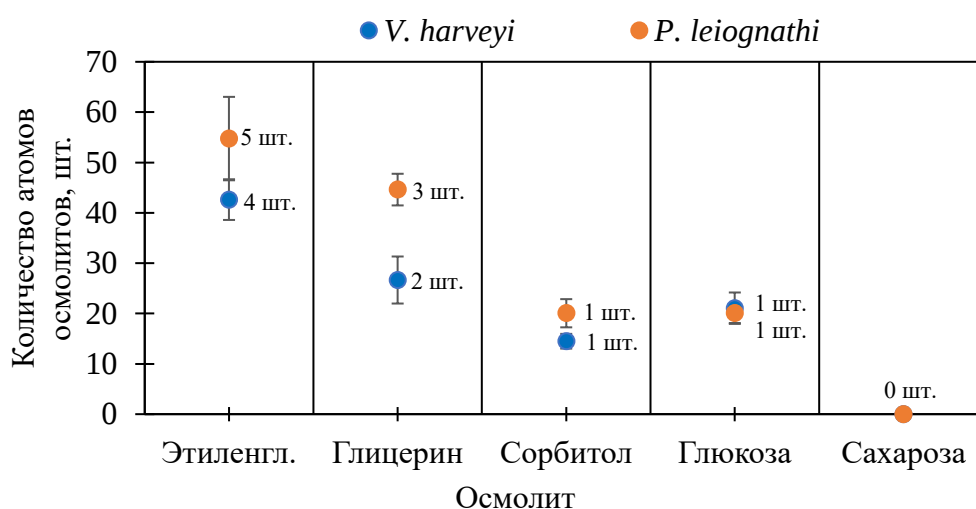


Рисунок 3.21 – Количество атомов осмолитов, присутствующих в полости активного центра люцифераз *V. harveyi* (синие маркеры) и *P. leiognathi* (оранжевые маркеры), для моделей с 40%-й концентрацией осмолитов. Показаны средние значения (точки) и стандартное отклонение (планки погрешностей) за последние 20 нс молекулярной динамики. Около каждой точки указано оценочное количество молекул осмолита.

Аналогичный расчёт был проведен и для молекул воды (Рисунок 3.22). В отсутствие осмолитов количество молекул воды в каталитической полости двух люцифераз практически идентичное. Этиленгликоль и глицерин, обладая малым молекулярным размером, вытесняют молекулы воды из активного центра люцифераз, снижая их количество примерно в два раза по сравнению с моделью исключительно водного окружения. Зафиксированное увеличение объема каталитической полости в присутствии сорбитола (Рисунок 3.20) не привело к росту числа молекул этого осмолита в ней (Рисунок 3.21), но зато увеличило количество молекул воды, приблизив его к значению в буфере (Рисунок 3.22). Глюкоза, плохо проникая в активный центр, тем не менее вытесняет оттуда часть молекул воды. Для сахарозы получено, что она из-за стерических ограничений не может проникать в область связывания субстратов, но вместе с тем не препятствует свободному проникновению воды. В

целом, стоит отметить, что если доступ осмолитов к активному центру фермента зависит от типа люциферазы, то на количество молекул воды в полости прежде всего влияет тип осмолита, а не фермента. Кроме того, присутствие осмолитов может приводить к локальным конформационным перестройкам и появлению новых полостей в структуре белка. Это влечёт увлечение объема активного центра, куда может проникать еще большее количество молекул воды, но который не доступен для молекул осмолитов из-за стерических ограничений.

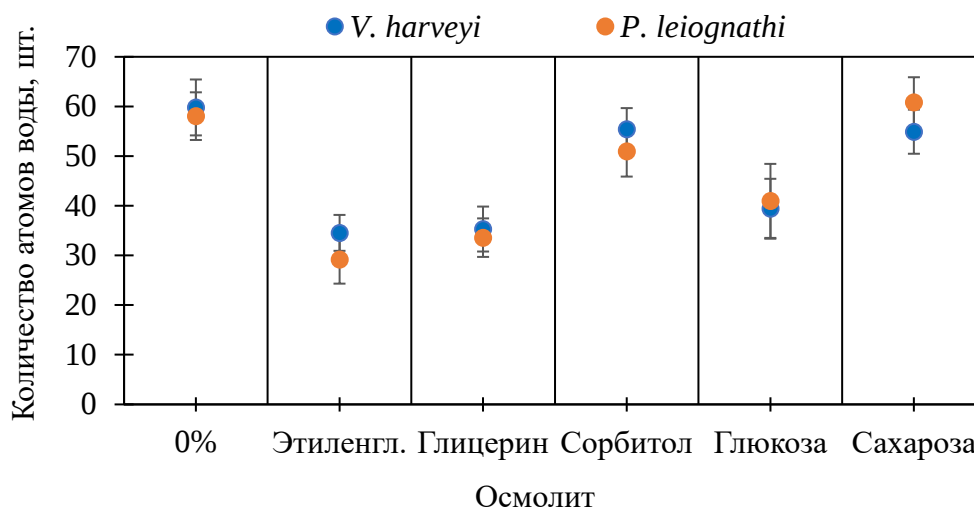


Рисунок 3.22 – Количество атомов воды, присутствующих в полости активного центра люцифераз *V. harveyi* (синие маркеры) и *P. leiognathi* (оранжевые маркеры), для моделей с водой (0%) и 40%-й концентрацией осмолитов. Показаны средние значения (точки) и стандартное отклонение (планки погрешностей) за последние 20 нс молекулярной динамики.

При вариации концентраций глицерина и сахарозы установлено, что люцифераза *V. harveyi* по-прежнему обладает большим объемом активного центра, чем фермент *P. leiognathi* (Рисунок 3.23). При этом, если объем активного центра люциферазы *P. leiognathi* мало меняется с ростом концентрации осмолитов, то размер каталитической полости фермента *V. harveyi* увеличивается вплоть до 30%-й концентрации глицерина или сахарозы. При 40%-й концентрации объем активного центра снижается у обеих люцифераз, а для фермента *P. leiognathi* в присутствии сахарозы объем становится таким же, как и в отсутствии осмолитов.

Расчет количества атомов осмолитов в полости активного центра люцифераз при вариации их концентрации показал, что сахароза при содержании 5-40% не способна проникать в активный центр исследуемых ферментов. Для люциферазы *V. harveyi* количество атомов глицерина не превышало десяти штук при концентрации 5, 10, 20 и выросло до

тридцати при 30 и 40% (Рисунок 3.24). Это говорит о том, что при малых концентрациях в активном центре находится постоянно примерно одна молекула глицерина, при больших – две. Для люциферазы *P. leiognathi* тенденция несколько иная: при 5 и 10%-й концентрации количество атомов в активном центре аналогична таковому в активном центре фермента *V. harveyi*; при 20 и 30%-й концентрации количество атомов глицерина колеблется около 25-ти; при 40%-й концентрации количество этого осмолита в активном центре *P. leiognathi* значительно больше, чем в полости *V. harveyi* и составляет в среднем четыре молекулы.

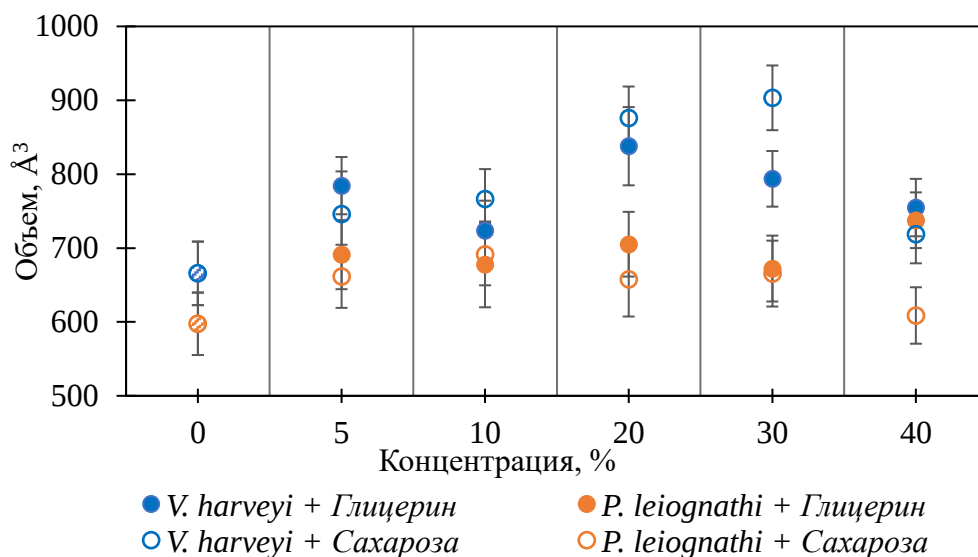


Рисунок 3.23 – Объем активного центра бактериальных люцифераз *V. harveyi* (синие маркеры) и *P. leiognathi* (оранжевые маркеры) в воде (заштрихованные маркеры) и смесях с глицерином (заполненные маркеры) и сахарозой (незаполненные маркеры) разных концентраций. Показаны средние значения (точки) и стандартное отклонение (планки погрешностей) за последние 20 нс молекулярной динамики.

Установлено, что сахароза при любых исследованных концентрациях не оказывает влияния на количество молекул воды в активном центре (Рисунок 3.25). Глицерин же при 30 и 40%-й концентрации вытесняет молекулы воды из полости активного центра обеих люцифераз.

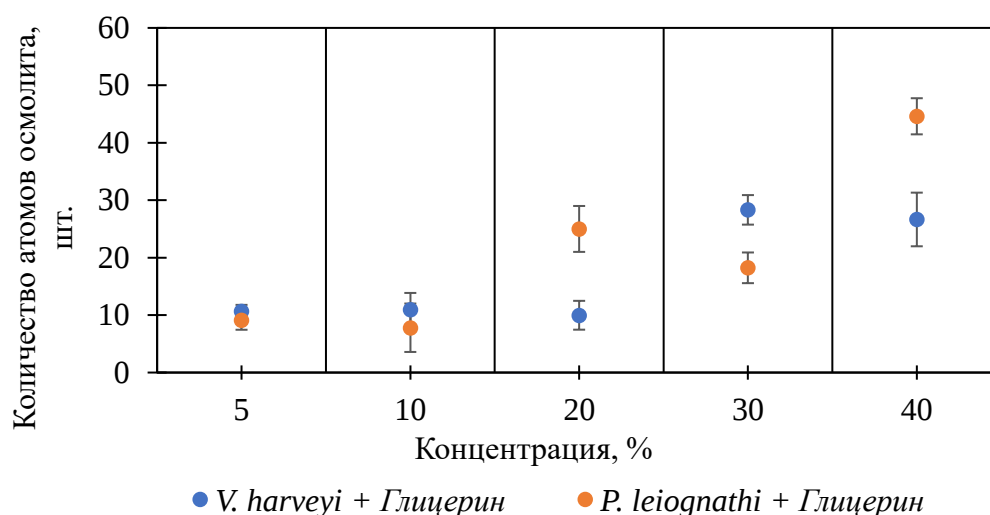


Рисунок 3.24 – Количество атомов глицерина, присутствующих в полости активного центра люцифераз *V. harveyi* (синие маркеры) и *P. leiognathi* (оранжевые маркеры) при разных концентрациях осмолита. Показаны средние значения (точки) и стандартное отклонение (планки погрешностей) за последние 20 нс молекулярной динамики. Для моделей с 5-40% сахарозы количество атомов осмолита в полости активного центра люцифераз было равно нулю.

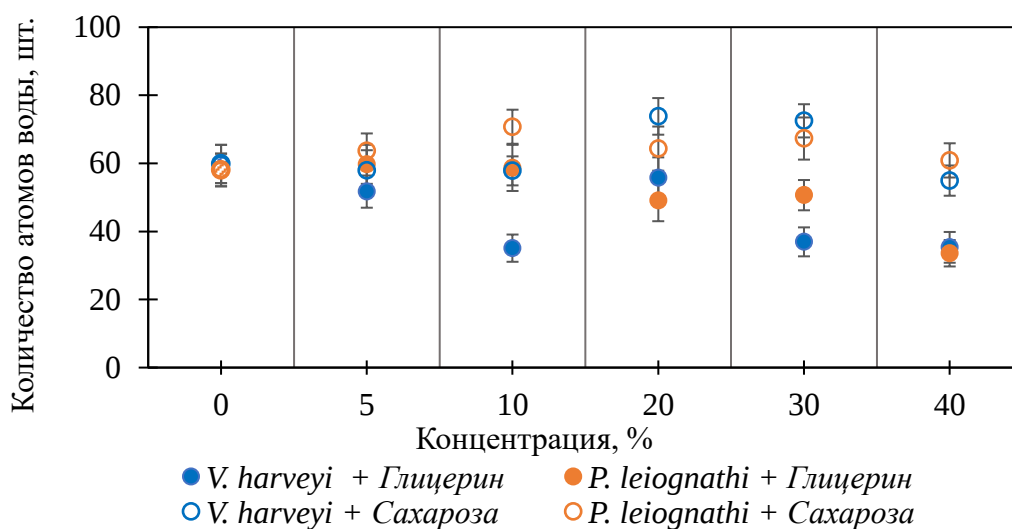


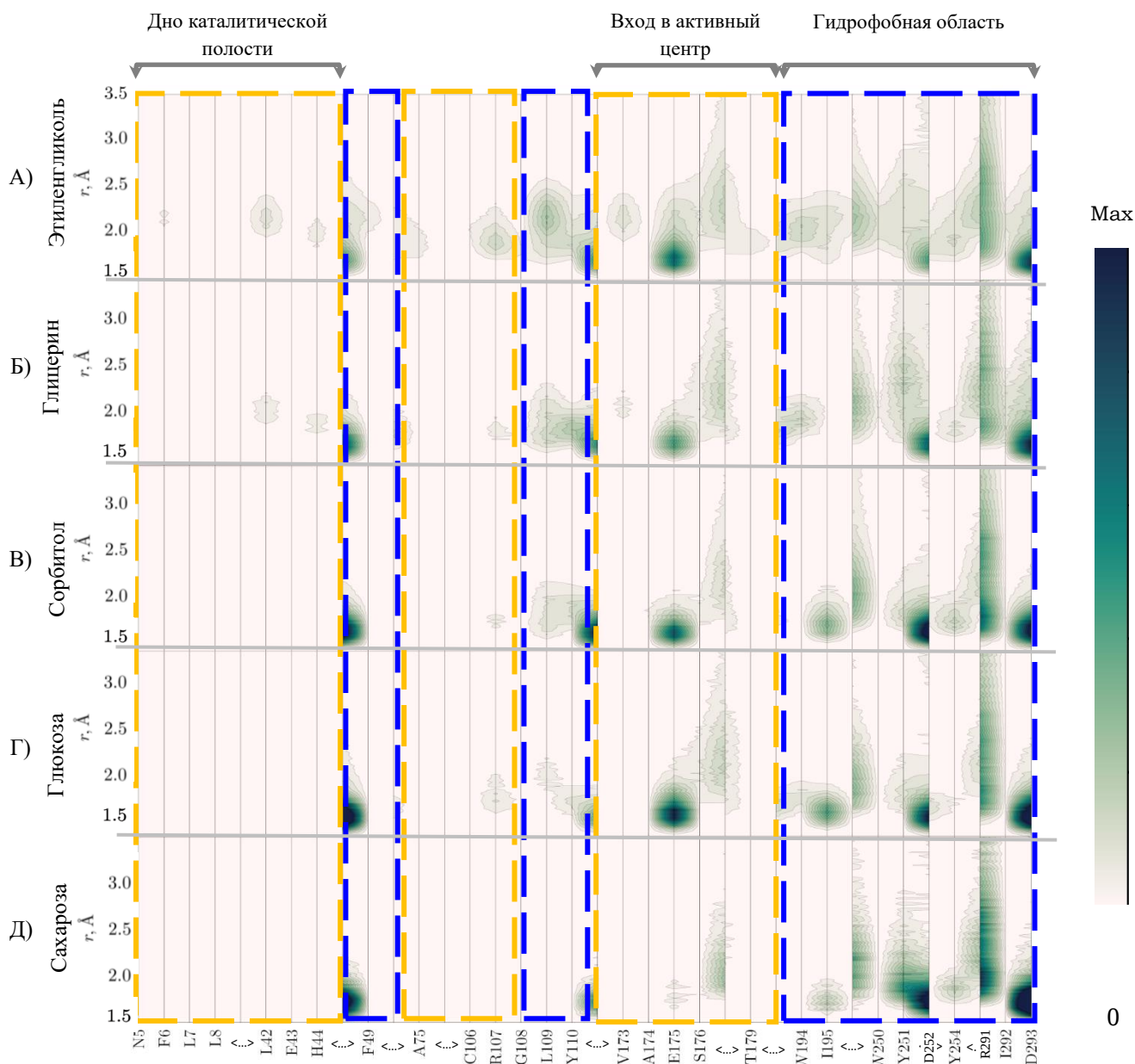
Рисунок 3.25 – Количество атомов воды, присутствующих в полости активного центра люцифераз *V. harveyi* (синие маркеры) и *P. leiognathi* (оранжевые маркеры), в воде (заштрихованные маркеры) и смесях с глицерином (заполненные маркеры) и сахарозой (незаполненные маркеры) разных концентраций. Показаны средние значения (точки) и стандартное отклонение (планки погрешностей) за последние 20 нс молекулярной динамики.

Анализ локализации молекул осмолитов относительно аминокислотных остатков активного центра люцифераз

Функция распределения минимального расстояния (MDDF) позволяет оценить доступность отдельных аминокислотных остатков активного центра фермента для молекул осмолитов в ходе молекулярной динамики. Используя программный модуль *ComplexMixtures.jl*, трехмерное распределение молекул растворителя можно представить в двухмерной форме в виде изолиний с цветовой дифференциацией вероятностных распределений. Анализ распределения осмолитов проводили на расстоянии от 1,5-3,5 Å от поверхности бактериальных люцифераз (в таком интервале наибольшая вероятность образования водородной связи между группами белка и растворителя).

Представленные на рисунках 3.26 и 3.27 изокарты отображают вклад отдельных аминокислотных остатков активного центра люцифераз в общую функцию распределения минимального расстояния молекул осмолитов, представленную на рисунках 3.9-3.12. Диапазон шкалы вкладов для цветового градиента определялся автоматически для каждого рисунка (выбранного участка последовательности), без общей нормировки по всему белку, что позволило обнаружить доступные для растворителя участки, даже если вероятность доступа мала. Это возможно благодаря исключению из нормировки аминокислотных остатков, заведомо экспонированных в растворитель. Появление на изокартах областей, отличных от нуля, говорит о том, что молекулы растворителя могут приближаться к соответствующему аминокислотному остатку на расстояние образования водородной связи.

Анализ проводили на МД-траекториях, полученных для люцифераз в окружении молекул воды и осмолитов (40 вес.%) разного размера и природы (этиленгликоль, глицерин, сорбитол, глюкоза, сахароза). Изокарты строили относительно аминокислотных остатков активного центра, которые были определены ранее (Таблица 3.3). Их условно можно разделить на две группы: (1) внутренние (позиции 6, 7, 8, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 49, 74, 75, 77, 106, 107, 108, 109, 110), которые расположены глубоко в белковой глобуле и формируют дно полости активного центра фермента; (2) внешние (позиции 173, 174, 175, 176, 179, 193, 194, 195, 250, 251, 254, 292, 293), которые находятся преимущественно у входа в активный центр. На рисунках 3.26 и 3.27 представлены изокарты распределения минимального расстояния до различных осмолитов от аминокислотных остатков обоих типов, сгруппированных также в соответствии с центрами связывания субстратов люциферазы.

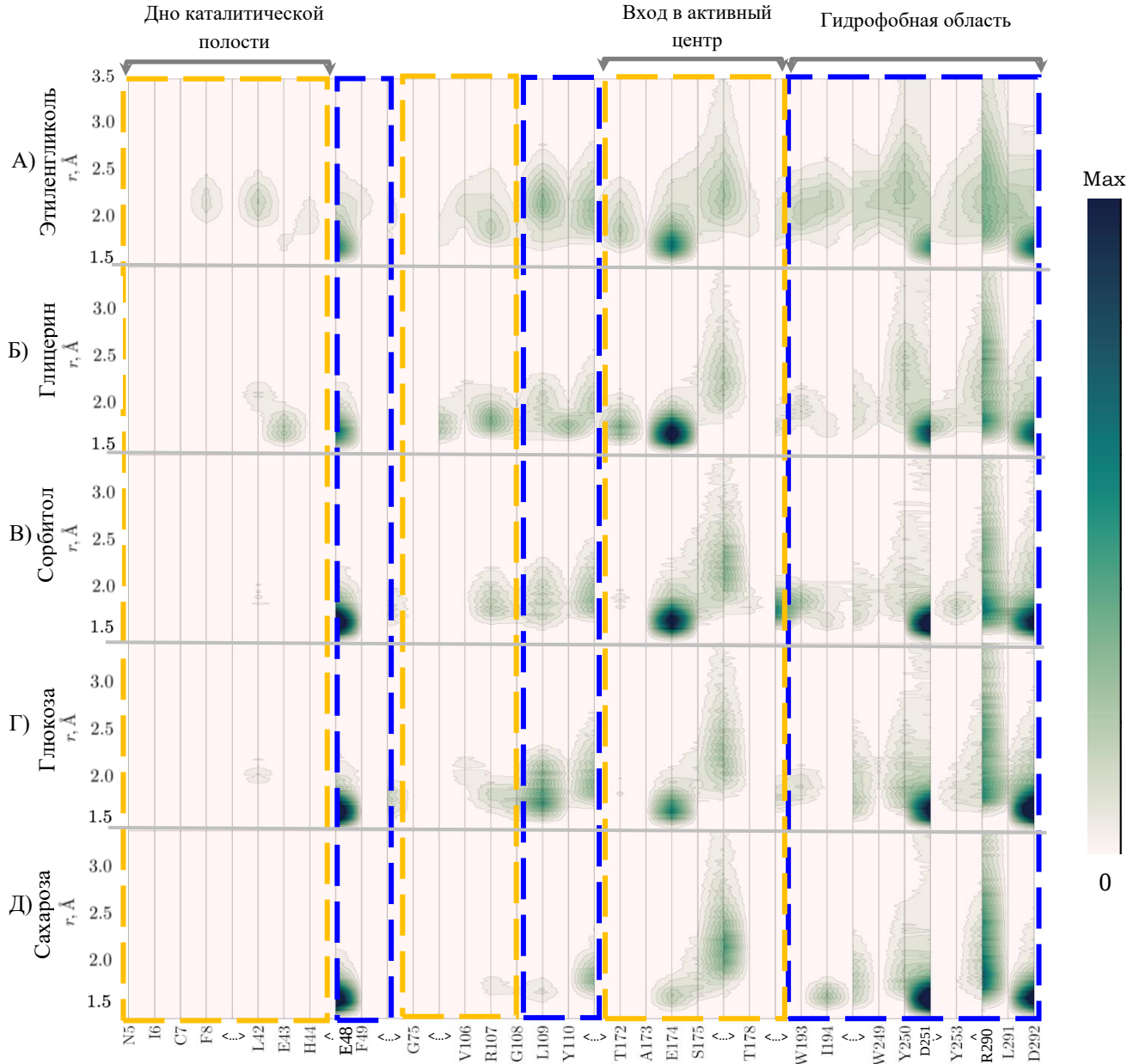


А.о. в последовательности α -субъединицы люциферазы *V. harveyi*

Рисунок 3.26 – Двухмерное представление распределения минимального расстояния молекул осмолитов (MDDF) до отдельных аминокислотных остатков α -субъединицы люциферазы *V. harveyi*: (А) этиленгликоль, (Б) глицерин, (В) сорбитол и (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.

На рисунках 3.26 и 3.27 А, Б видно, что молекулы этиленгликоля и глицерина имеют доступ к аминокислотным остаткам, формирующим дно каталитической полости люцифераз. Причем для *P. leiognathi* изокарты в этой области ярче, чем для гомолога, то есть

вероятность нахождения там осмолитов выше. Это верно и для α Phe8, важная роль которого в формировании активного центра люциферазы *P. leiognathi* была отмечена ранее. Для других осмолитов эта область каталитической полости оказывается недоступна (Рисунок 3.26 и 3.27, В-Д).



А.о. в последовательности α -субъединицы люциферазы *P. leiognathi*

Рисунок 3.27 – Двухмерное представление распределения минимального расстояния молекул осмолитов (MDDF) до отдельных аминокислотных остатков α -субъединицы люциферазы *P. leiognathi*: (А) этиленгликоль, (Б) глицерин, (В) сорбитол и (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.

Схожая ситуация наблюдалась и для других аминокислотных остатков, стабилизирующих связанный флавин. Эти участки активного центра на рисунках 3.26 и 3.27 выделены желтой пунктирной рамкой. Область связывания FMN у люциферазы *V. harveyi* оказалась менее доступна для осмолитов, чем у белка *P. leiognathi*. Это характерно для аминокислотных остатков в позициях 75, 106 и 107, взаимодействующих с изоаллоксазиновым кольцом флавина.

То же самое наблюдалось и для остатков в позициях 173, 175, 176 и 179, которые связывают фосфатный хвост FMN и расположены на входе в активный центр. Это верно и для сахарозы, для которой эта группа аминокислотных остатков у люциферазы *P. leiognathi* оказывается более доступной, несмотря на возможные стерические ограничения (Рисунок 3.27, Д). Резюмируя полученные результаты, можно сказать, что активный центр люциферазы *P. leiognathi* более доступен для молекул осмолитов, не смотря на меньший объем. Вероятно, это результат разной архитектуры каталитических полостей ферментов.

В тоже время, на примере двух люцифераз хорошо видна корреляция способности проникновения осмолитов в глубь каталитической полости фермента с их размерами. Например, вероятность нахождения осмолита около α L109 становится всё меньше и меньше в ряду панелей от А) до Д) на рисунках 3.26-3.27. Эти результаты хорошо согласуются с экспериментальными результатами. Лисица с коллегами в своей работе зафиксировали снижение интенсивности светоизлучения биолюминесцентной реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, в средах с этиленгликолем и глицерином (Рисунок 3.28, А) [14]. При этом сорбитол, глюкоза и сахароза не оказывают такого эффекта. Полученные результаты МД-моделирования указывают на возможный механизм такого негативного влияния. Этиленгликоль и глицерин из-за своего размера, могут проникать глубоко в активный центр, что снижает функциональную активность люциферазы. Другие осмолиты из-за стерических ограничений не оказывают значительного влияния на интенсивность светоизлучения. Более того, согласно представленным результатам в разделе 3.3, структурные параметры RMSD, R_g и SASA для люциферазы *P. leiognathi* в присутствии этиленгликоля выше, чем в других моделируемых средах. Это говорит о дополнительной дестабилизации белковой глобулы, что также может объяснить значительный спад биолюминесценции при высоких концентрациях этого осмолита.

Интересный эффект наблюдается для гидрофобной области активного центра, где расположен сайт связывания альдегида. На рисунках 3.26-3.27 эти участки структуры отмечены синей пунктирной рамкой. С увеличением размера осмолитов около аминокислотных остатков в позиции 49, 250, 292 для обеих люцифераз наблюдается рост частоты их присутствия на расстоянии образования водородной связи. То есть наиболее часто там

находятся осмолиты большого молекулярного размера, такие как сорбитол, глюкоза и сахароза. Это может объяснить экспериментально полученные результаты: в присутствии сорбитола, глюкозы, сахарозы снижалась константа ассоциации альдегида для люциферазы *P. leiognathi* (Рисунок 3.28, Б) [14]. В тоже время, для растворов с этиленгликолем, связывание с альдегидом наоборот увеличивалось. Возможно, это связано с тем, что относительно большие молекулы осмолитов имеют гидрофобные области, способные взаимодействовать с сайтом связывания альдегида, в отличие от высоко полярных и не гибких 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, α E48 и α D292). Эти аминокислотные остатки известны как элементы связывающих центров белков [131], и вероятно в исследованных нами системах они склонны связывать осмолиты.

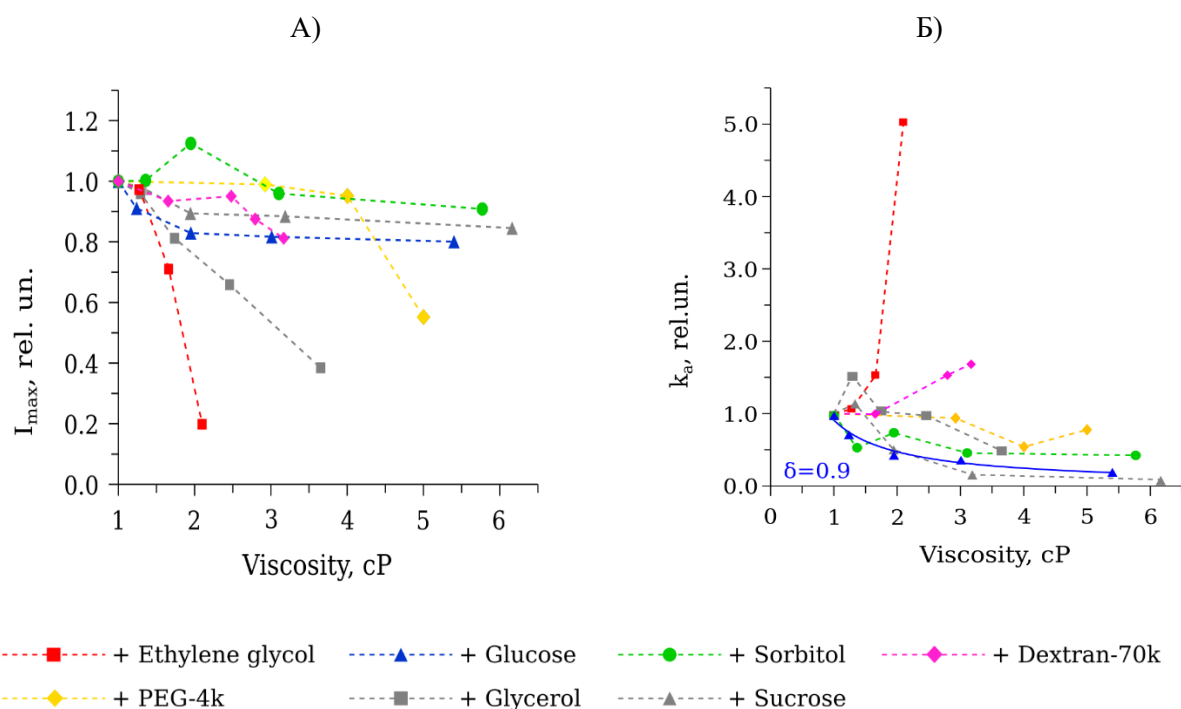


Рисунок 3.28 – Экспериментальные данные по влиянию осмолитов на кинетику биolumинесцентной реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*: (А) изменение максимальной интенсивности $I_{\max}$ и (Б) изменение константы связывания альдегида k_a при вариации концентрации осмолитов 10-40 вес.%. Взято из [14].

3.6 Взаимодействие осмолитов с функционально важными участками структуры бактериальных люцифераз

Подвижность аминокислотных остатков люцифераз в присутствии осмолитов

Для оценки подвижности аминокислотных остатков фермента был рассчитан параметр среднеквадратичной флуктуации (RMSF) C α -атомов люцифераз во время моделирования по формуле (1.18). На рисунках 3.29 и 3.30 показана разность значений RMSF в присутствии осмолита (RMSF_{осмолит}) и в его отсутствие (RMSF_{вода}):

$$\Delta\text{RMSF} = \text{RMSF}_{\text{осмолит}} - \text{RMSF}_{\text{вода}}.$$

Данные приведены только для α -субъединицы люцифераз *V. harveyi* и *P. leiognathi*, так как известно, что именно она содержит полость активного центра и другие функционально важные участки [134].

Видно, что значение ΔRMSF для большинства аминокислотных остатков обеих люцифераз близко к нулю (Рисунки 3.29 и 3.30), то есть исследованные осмолиты не оказали значительного влияния на их подвижность.

Однако для некоторых аминокислот было получено $\Delta\text{RMSF} \geq 0,5 \text{ \AA}$: для αPhe46 и αAsp217 люциферазы *V. harveyi* и αI151 люциферазы *P. leiognathi* в присутствии этиленгликоля. Несмотря на то, что первые два аминокислотных остатка являются высоко консервативными для семейства бактериальных люцифераз, их роль в каталитической функции ферментов пока не ясна.

Также наблюдается снижение подвижности ($\Delta\text{RMSF} < -0,5 \text{ \AA}$) для участка $\alpha\text{162-}\alpha\text{170}$ обеих люцифераз в присутствии всех исследованных осмолитов. Но функциональная важность этого сегмента структуры также еще не была исследована.

Было получено, что в присутствии сахарозы уменьшается подвижность мобильной петли бактериальных люцифераз (участок $\alpha\text{262-}\alpha\text{291}$). Данный сегмент белка играет важную роль в ходе каталитического акта: он прикрывает полость активного центра фермента после связывания субстратов [134, 138]. Для люциферазы *P. leiognathi* эффект стабилизации мобильной петли сахарозой выражен ярче, и более того, глюкоза оказывает аналогичный эффект (Рисунок 3.30, Г, Д). Также для этой люциферазы наблюдался рост подвижности мобильной петли в присутствии сорбитола (Рисунок 3.30, В), но экспериментальных данных по специфическому влиянию этого осмолита на кинетику биолюминесцентной реакции получено не было [14]. Параметр ΔRMSF C α -атомов люцифераз был также рассчитан и при вариации концентрации глицерина и сахарозы. Результаты представлены на рисунке 3.31.

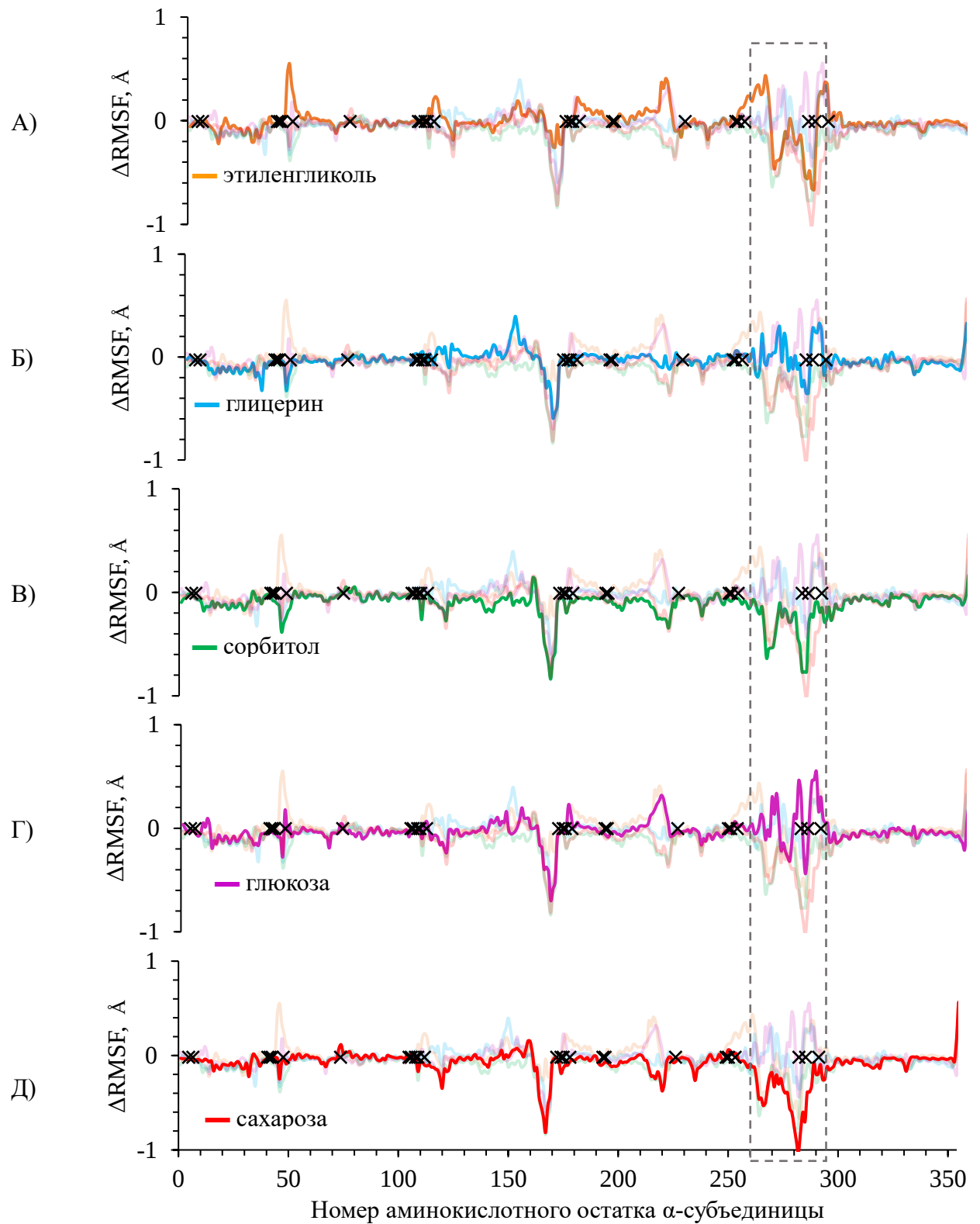


Рисунок 3.29 – ΔRMSF для C_α -атомов α -субъединицы люциферазы *V. harveyi* в присутствии осмолитов (40 вес.%) на последних 20 нс МД-траектории: этиленгликоль (А), глицерин (Б), сорбитол (В), глюкоза (Г) и сахароза (Д). Участок мобильной петли ($\alpha 262$ - $\alpha 291$) отмечен рамкой. Функционально важные аминокислотные остатки показаны маркерами.

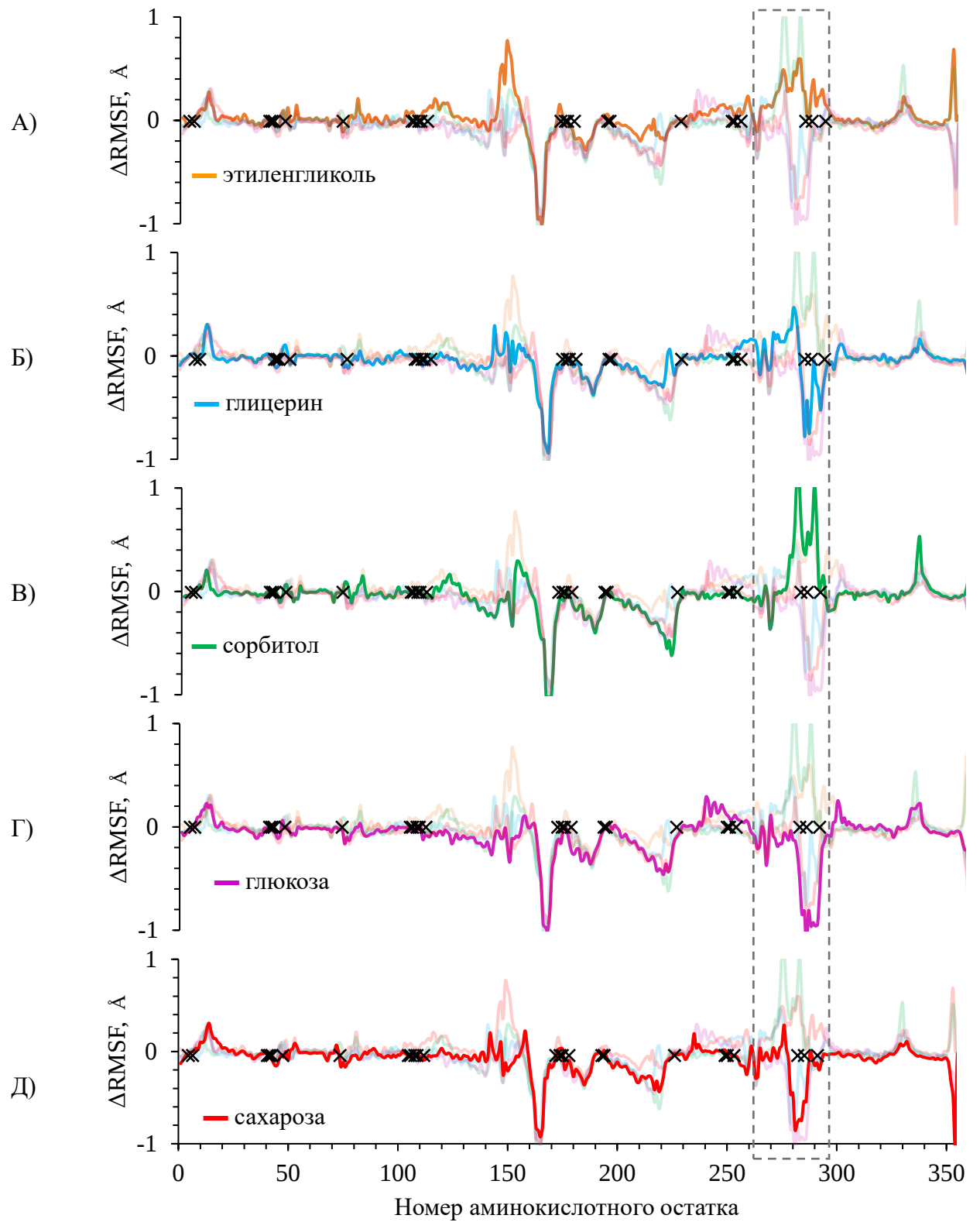


Рисунок 3.30 – ΔRMSF для C_α -атомов α -субъединицы люциферазы *P. leiognathi* в присутствии осмолитов (40 вес.%) на последних 20 нс МД-траектории: этиленгликоль (А), глицерин (Б), сорбитол (В), глюкоза (Г) и сахароза (Д). Участок мобильной петли ($\alpha 262$ - $\alpha 291$) отмечен рамкой. Функционально важные аминокислотные остатки показаны маркерами.

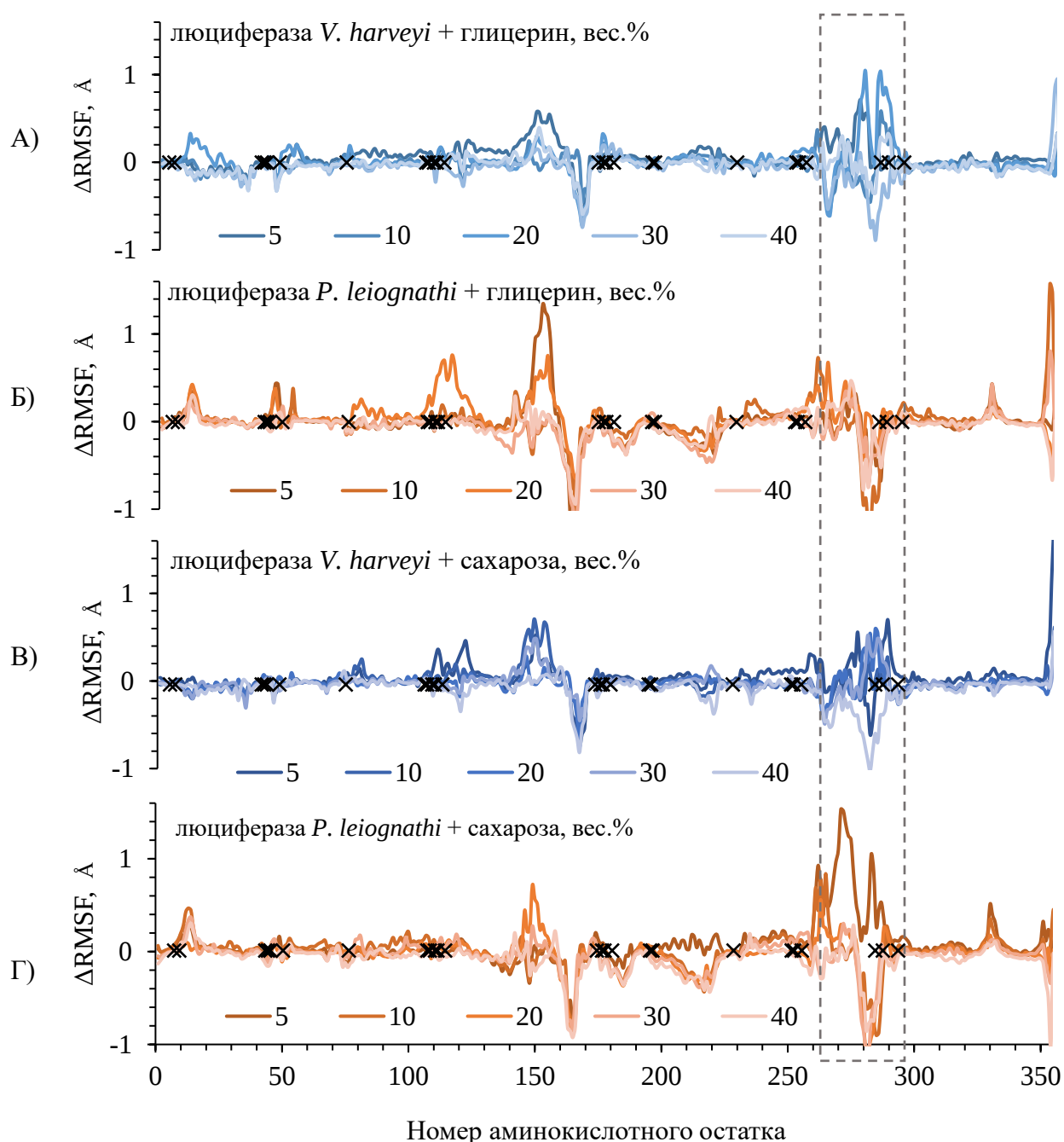


Рисунок 3.31 – ΔRMSF C_α -атомов α -субъединицы люциферазы *V. harveyi* (А, Б) и *P. leiognathi* (Б, Г) в присутствии разных концентраций глицерина (А, Б) и сахарозы (Б, Г) на последних 20 нс МД-траектории. Участок мобильной петли ($\alpha 262$ - $\alpha 291$) отмечен рамкой. Функционально важные аминокислотные остатки показаны маркерами.

Видно, 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. Также глицерин и сахароза при любых концентрациях снижают подвижность участка $\alpha 162$ - $\alpha 170$ для обоих ферментов. Но при малом количестве этих

осмолитов наблюдается небольшая дестабилизация соседнего сегмента $\alpha 143$ - $\alpha 157$, функциональная значимость которого также неизвестна.

Как упоминалось выше (раздел 3.5), аминокислотные остатки α -субъединицы в позициях 6-8, 40-45, 74-77 и 106-110 расположены на дне каталитической полости люцифераз. По рисункам 3.29-3.31 видно, что присутствие осмолитов не изменяет их подвижность ($\Delta RMSF \approx 0$), не зависимо от молекулярного размера осмолита. Аминокислотные остатки в позициях $\alpha 173$ - $\alpha 179$, $\alpha 193$ - $\alpha 195$ и $\alpha 250$ - $\alpha 254$ формируют вход в каталитическую полость, они более доступны для молекул среды. Однако их подвижность тоже не изменяется в присутствии исследованных осмолитов.

3.7 Влияние осмолитов на конформацию боковых цепей функционально важных аминокислотных остатков люциферазы

Известно, что эффективное связывание субстратов в активном центре возможно только при правильной конформации боковых цепей функционально важных аминокислотных остатков. Присутствие осмолитов в растворе и их проникновение в полость активного центра может негативно влиять на возможность их поворота в каталитически активное положение. Для проверки такого механизма влияния осмолитов на активность бактериальных люцифераз были проанализированы конформации (двухгранные углы χ_1 и χ_2 боковых цепей) для функционально важных аминокислотных остатков люцифераз, указанных в таблице 3.3. На основе полученных результатов можно сделать вывод, что значительного влияния осмолитов на положение боковых цепей не происходит. Это наблюдается как при вариации размера осмопротектора, так и при вариации концентрации глицерина и сахарозы. Особенно это хорошо видно для аминокислотных остатков, формирующие дно каталитической полости люцифераз (α Leu42 и α Glu43), а также для α Trp194 и α Trp250 с массивными гидрофобными боковыми цепями, чья возможность к повороту ограничена плотной упаковкой окружения.

Отдельно стоит выделить остаток α Glu175. В расшифрованных кристаллических структурах люциферазы *V. harveyi* отмечено, что боковая цепь этого остатка находится в двух конформациях (Рисунок 3.32) [134, 136]. Первая образует сильные водородные связи с боковой цепью α Ser176 и Thr179 и больше экспонирована в растворитель, в то время как вторая ориентирована внутрь активного центра. С помощью методов молекулярного докинга было показано, в первой конформации связывание фосфатного хвоста флавина невозможно из-за стерических ограничений, что не дает образовать люциферазе комплекс с

ним [136]. Следовательно, каталитически активная конформация α Glu175 соответствует положению 2.

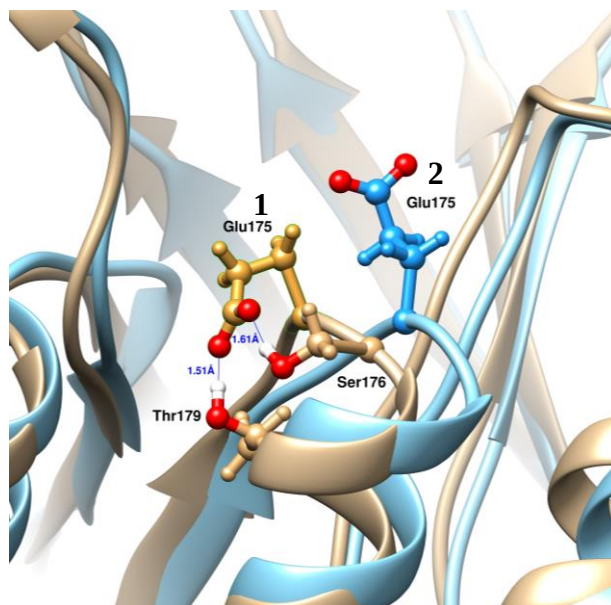


Рисунок 3.32 – Трехмерное выравнивание структуры бактериальной люциферазы *V. harveyi* в присутствии глицерина (коричневый) и сахарозы (голубой) (40 %), после молекулярной динамики.

Сравнение распределения двухгранных углов боковой цепи α Glu175 люциферазы *V. harveyi* в присутствии различных осмолитов (40 %) представлено на рисунке 3.33. Видно, в водном окружении значения χ_1 и χ_2 однозначны, в большинстве случаев они равны $\approx 70^\circ$ и $\approx 300^\circ$ соответственно. Это положение ближе к каталитически неактивной конформации. Присутствие осмолитов в растворе приводит к появлению новых конформаций. Так, пики распределения углов около $\chi_1 = 300^\circ$ и $\chi_2 = 180^\circ$ соответствует положение боковой цепи ближе к каталитически активному. Исключением является глицерин, чья карта распределений наиболее схожа с картой для водного окружения.

При построении аналогичных карт для люциферазы *P. leiognathi* наблюдается иная тенденция (Рисунок 3.34). В присутствии всех рассмотренных растворителей ориентация боковой цепи α Glu175 согласно значениям χ_1 и χ_2 находится ближе к каталитической активной конформации. Это верно также и для водного окружения. Возможно, отсутствие конформационных ограничений для люциферазы *P. leiognathi* объясняет различия в её кинетических свойствах по сравнению с люциферазой *V. harveyi* [13, 14].

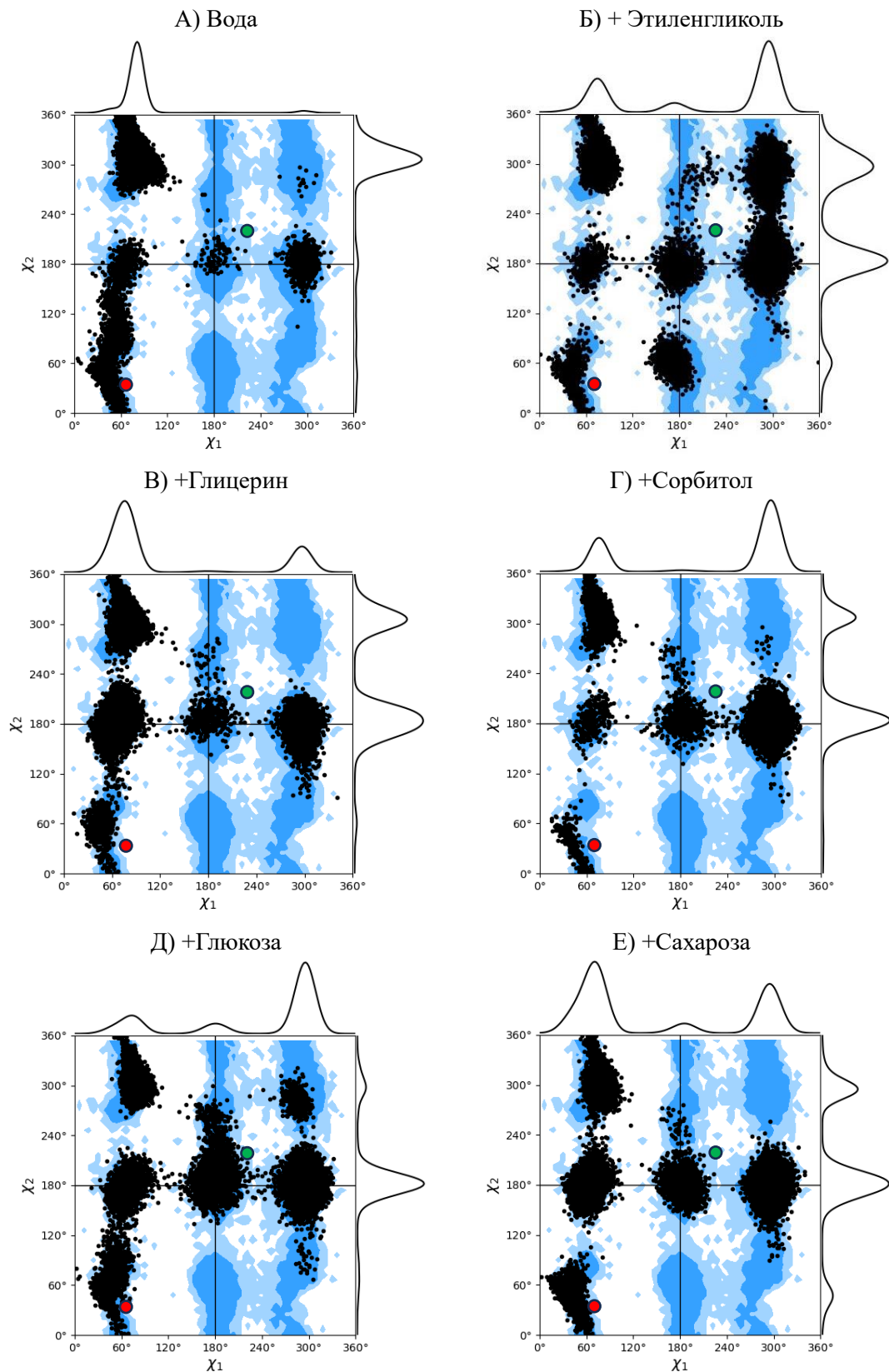


Рисунок 3.33 – Распределение двугранных углов χ_1 и χ_2 α Glu175 люциферазы *V. harveyi* в водном окружении (А) и в присутствии различных осмолитов (40%) (Б-Е) по трем молекулярно-динамическим траекториям. Синие поля – доступное положение боковых цепей любых аминокислотных остатков согласно библиотеке [99]. ● – конформация 1, ● – конформация 2

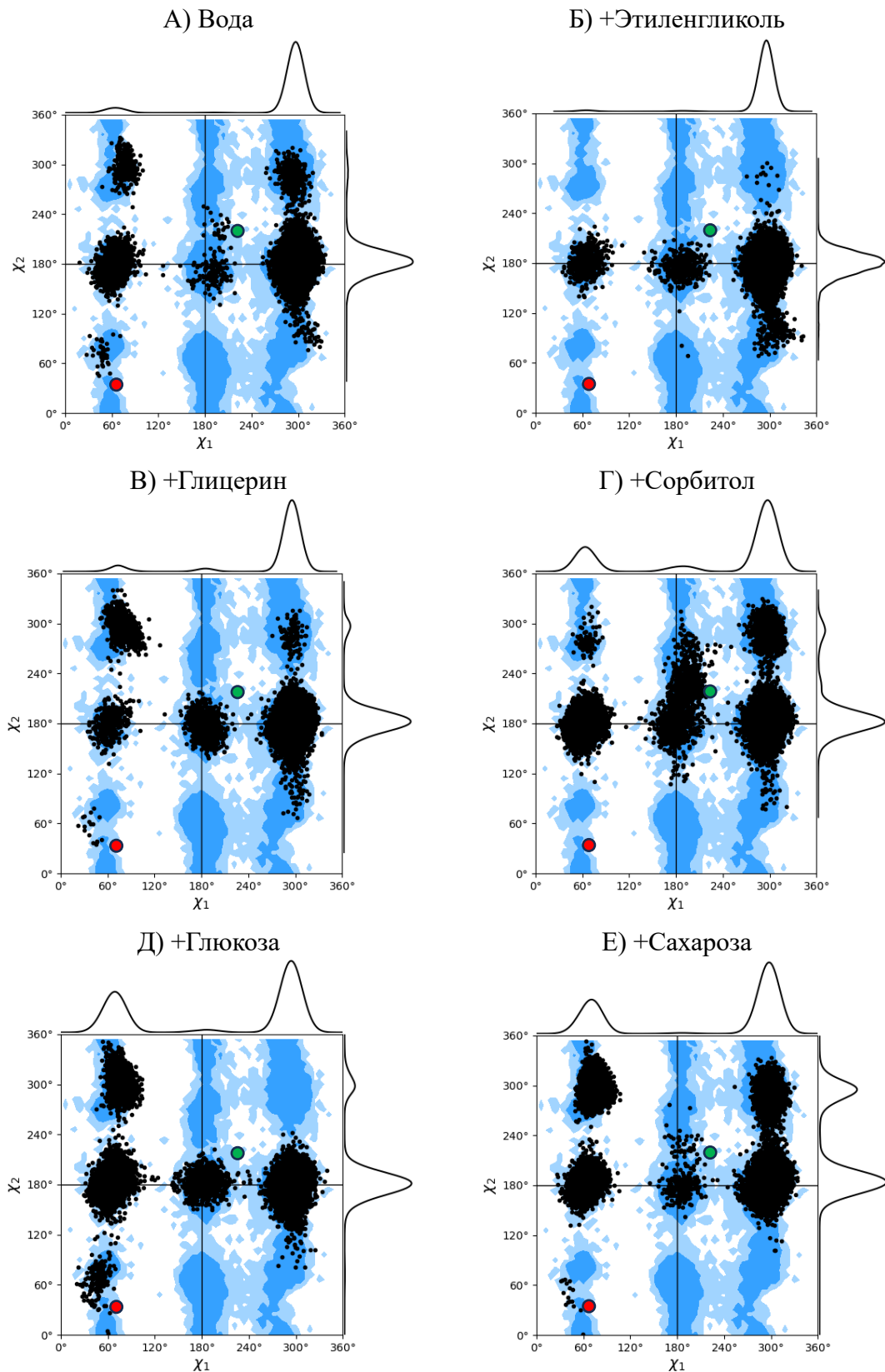


Рисунок 3.34 – Распределение двугранных углов χ_1 и χ_2 α Glu175 люциферазы *P. leiognathi* в водном окружении (А) и в присутствии различных осмолитов (40%) (Б-Е) по трем молекулярно-динамическим траекториям. Синие поля – доступное положение боковых цепей любых аминокислотных остатков согласно библиотеке [99]. ● – конформация 1, ● – конформация 2

3.8 Энергии невалентных взаимодействий белков и осмолитов в моделируемых системах

Для модельных систем были рассчитаны энергии кулоновского и ван-дер-ваальсова взаимодействий в парах белок-белок, белок-вода, белок-осмолит, вода-осмолит, осмолит-осмолит. Было получено, что основной вклад в энергию кулоновского взаимодействия белков внесли внутрибелковые взаимодействия. Стоит отметить, что это верно для обеих люцифераз. При этом осмолиты частично заменяют молекулы воды, взаимодействующие с ферментом, без существенного изменения полной величины кулоновской энергии (Рисунок 3.35, А). В то же время, общая энергия ван-дер-ваальсова взаимодействия исследуемых систем несколько увеличивалась в присутствии соразтворителей за счет взаимодействия белок-осмолит (Рисунок 3.35, Б). Также для люциферазы *P. leiognathi* было обнаружено, что энергия внутрибелковых ван-дер-ваальсовых взаимодействий становятся ниже в присутствии этиленгликоля по сравнению с водной средой ($-19,04 \pm 0,17$ и $-19,51 \pm 0,16$ МДж/моль соответственно). Это в целом согласуется с более высокими значениями параметров RMSD, R_g и SASA данного фермента как по сравнению с только водным окружением, так и по сравнению с люциферазой *V. harveyi*, что указывает на менее компактную структуру белка, чем в других промоделированных системах (Рисунки 3.5-3.8). В свою очередь, для люциферазы *V. harveyi* достоверной разницы в значениях энергии нет, что также соответствует большей стабильности белковой глобулы в присутствии рассматриваемых осмолитов.

Для молекул соразтворителя основной вклад в энергию нековалентных взаимодействий вносит кулоновское взаимодействие внутри групп осмолит-вода и осмолит-осмолит. На рисунке 3.36 энергия взаимодействий белок-осмолит меньше по сравнению со значениями для других групп, особенно для кулоновских взаимодействий. Но стоит отметить, что с увеличением размера осмолита энергия нековалентных взаимодействий также увеличивается практически в два раза. Результаты для самого маленького из рассмотренных растворителей (этиленгликоль) и самого большого (сахароза) приведены в таблице 3.4.

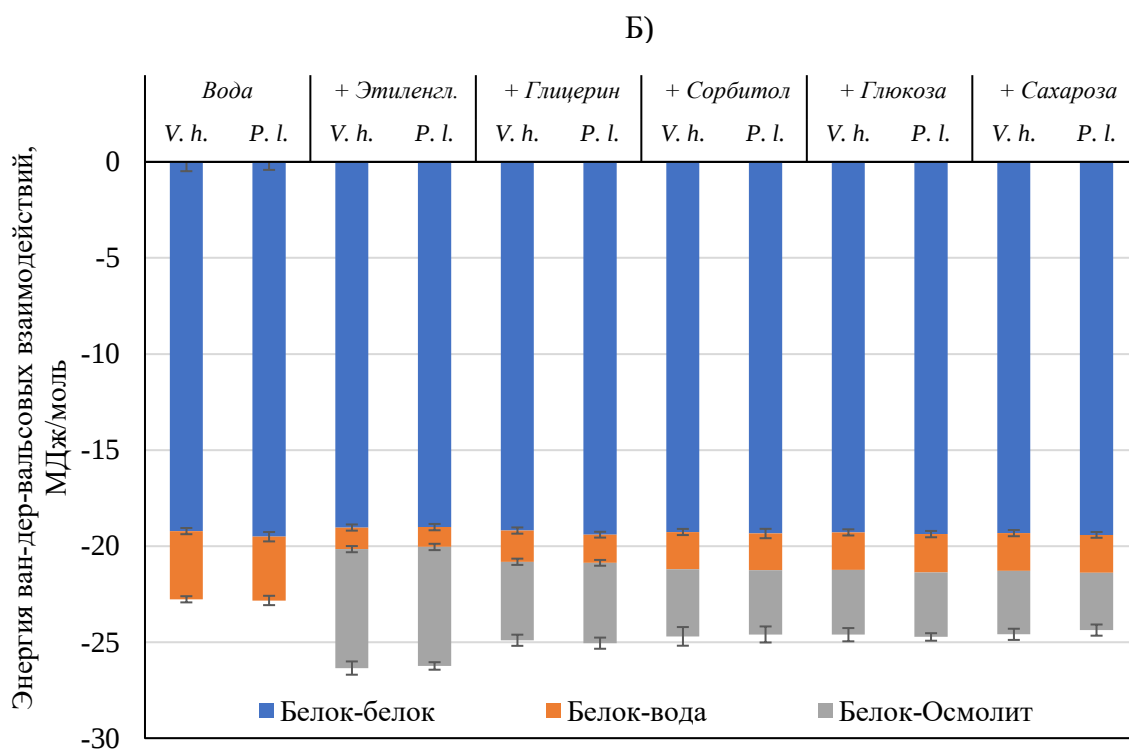
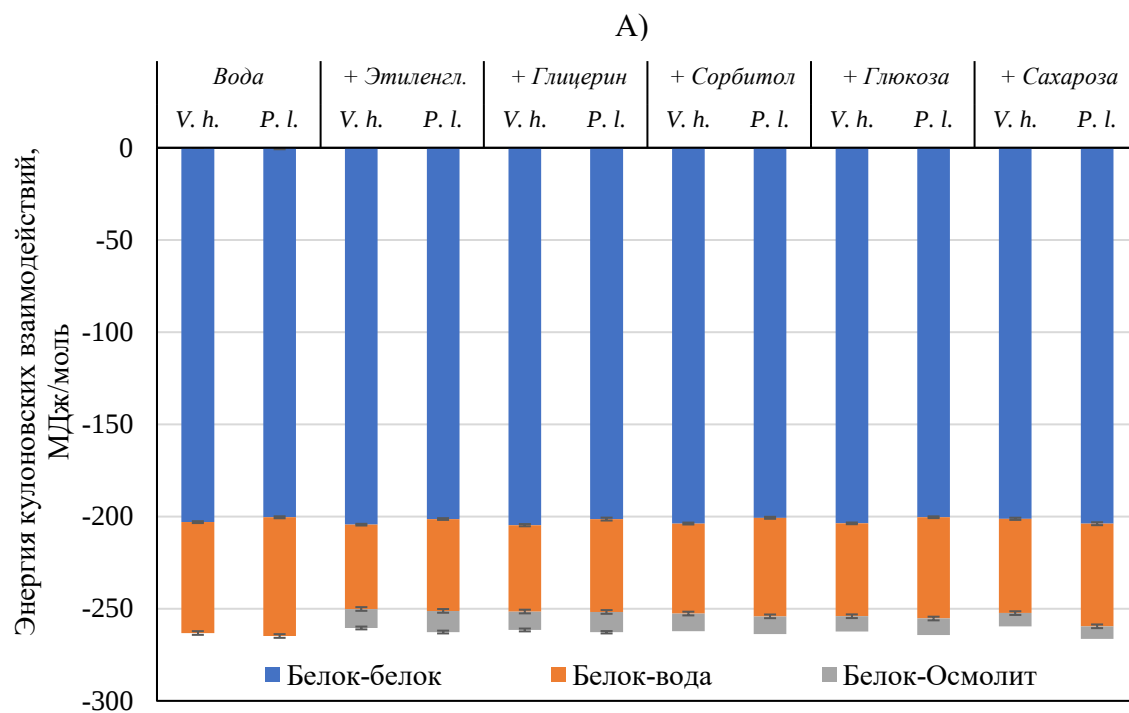


Рисунок 3.35 – Энергия невалентных кулоновских (А) и ван-дер-ваальсовых (Б) взаимодействий люцифераз *V. harveyi* (V. h.) и *P. leiognathi* (P. l.) с компонентами моделируемых сред. Расчет для последних 20 нс молекулярной динамики.

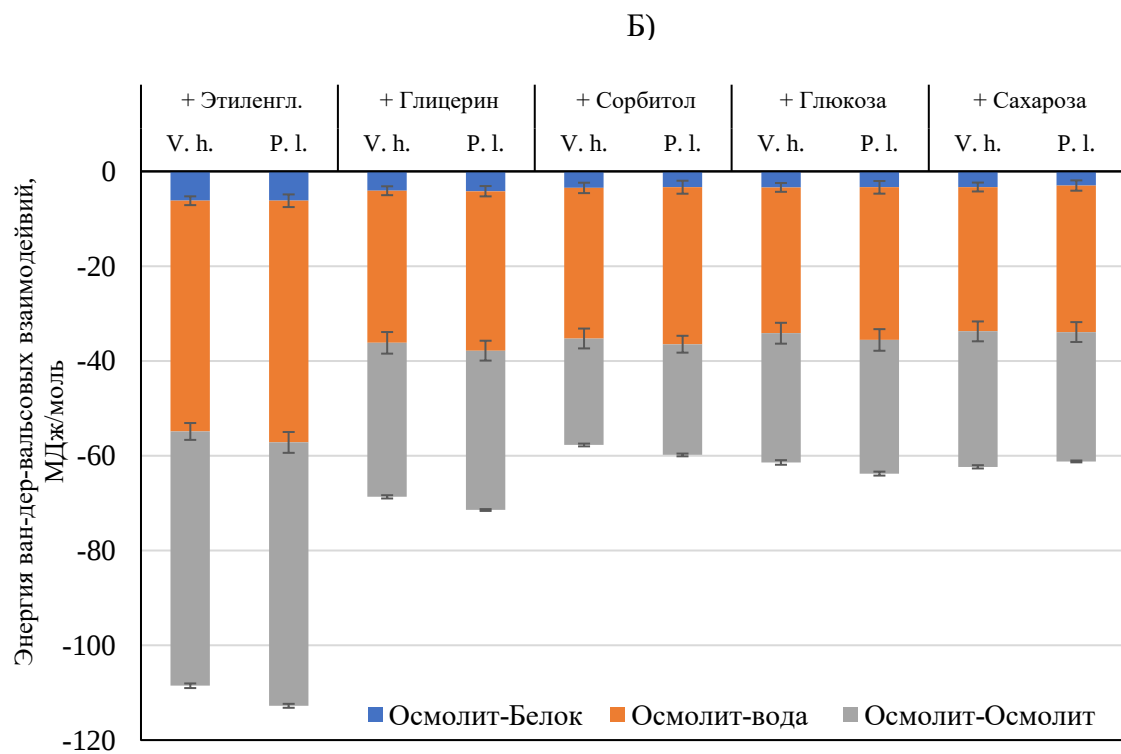
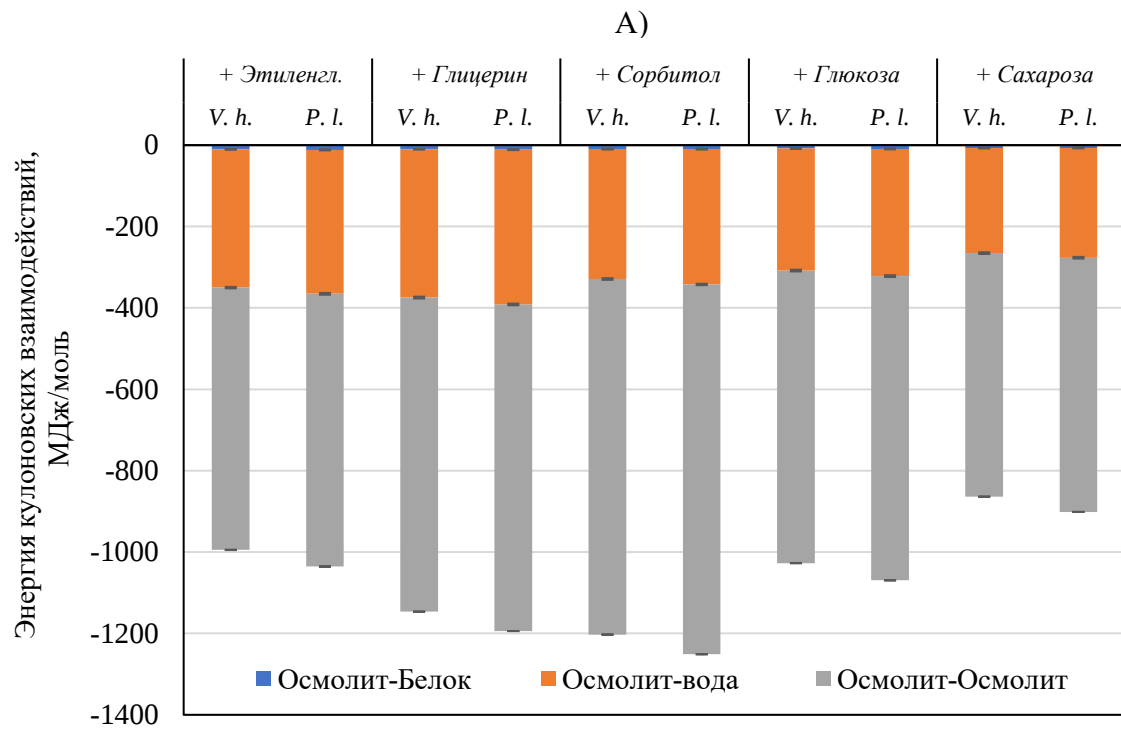


Рисунок 3.36 – Энергия невалентных (А) кулоновских, (Б) ван-дер-ваальсовых взаимодействий разных осмолитов с компонентами моделируемых сред для люцифераз *V. harveyi* (*V. h.*) и *P. leiognathi* (*P. l.*). Расчет для последних 20 нс молекулярной динамики.

Таблица 3.4 – Энергия нековалентных взаимодействий для люцифераз *V. harveyi* и *P. leiognathi* в присутствии этиленгликоля и сахарозы.

Люцифераза	Энергия взаимодействий, МДж/моль			
	Этиленгликоль, 40 вес.%		Сахароза, 40 вес.%	
	Кулоновских	Ван-дер-ваальсовых	Кулоновских	Ван-дер-ваальсовых
<i>V. harveyi</i>	$-10,23 \pm 0,41$	$-6,20 \pm 0,29$	$-7,19 \pm 0,40$	$-3,30 \pm 0,18$
<i>P. leiognathi</i>	$-11,5 \pm 0,49$	$-6,19 \pm 0,35$	$-6,78 \pm 0,25$	$-2,99 \pm 0,23$

3.9 Заключение к главе

Анализ многочисленных структурных параметров двух люцифераз в окружении молекул воды и осмолитов показал, что полиолы и сахара, за исключением этиленгликоля, не являются причиной изменения большей части этих параметров.

В частности, сохраняется компактность укладки белковых глобул, не изменяется конформация функционально важных аминокислотных остатков ферментов, подвижность основной цепи белка сохраняется на одном уровне для большей части цепи.

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 значимые корреляции ($|r| > 0,9$) приведены в таблице 3.5.

Анализ показал, что наблюдается высокая корреляция между влиянием сред с осмолитами на связывание люциферазой восстановленного флавина ($\delta(k_1)$) и количеством атомов осмолитов, попадающих в среднем в полость активного центра фермента за время молекулярной динамики ($r = -0,98$). Кроме этого, каталитическая константа фермента показала высокую корреляцию с энергией кулоновского взаимодействия между белком и осмолитом ($r = 0,92$). Это согласуется с наблюдением, которое обсуждалось в разделе 3.4, о локализации молекул осмолитов около заряженных аминокислотных остатков в активном центре и у поверхности мобильной петли ферментов.

Также для каталитической константы наблюдается сильная корреляция с 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). Для константы связывания альдегида была обнаружена корреляция с энергией ван-дер-ваальсова взаимодействия между белком и осмолитом, а также между осмолитом и водой, что может быть результатом гидрофобного характера связывания люциферазой этого субстрата.

Таблица 3.5 – Коэффициенты линейной корреляции r между структурными (модельными) характеристиками бактериальной люциферазы *P. leiognathi* в окружении осмолитов и экспериментальными кинетическими характеристиками реакции. Жирным шрифтом выделены значения $|r| > 0,9$.

Структурный параметр из молекулярной динамики	Экспериментальный параметр кинетики реакции ^а		
	k_{cat} ^б	K_a ^в	$\delta (k_1)$ ^г
Количество атомов осмолита в активном центре, (Рисунок 3.21)	–0,56	0,68	–0,98
Энергия кулоновского взаимодействия между белком и осмолитом (Рисунок 3.35, А)	0,92	0,19	0,68
Энергия ван-дер-ваальсова взаимодействия между белком и осмолитом (Рисунок 3.35, Б)	0,68	0,93	0,94
Энергия ван-дер-ваальсова взаимодействия между осмолитом и водой (Рисунок 3.36, Б)	0,56 (0,96) ^д	–0,99 (–0,97) ^д	0,80 (–0,84)
Энергия ван-дер-ваальсова взаимодействия между молекулами осмолита (Рисунок 3.36, Б)	0,38 (0,99) ^д	–0,43 (0,53) ^д	0,82 (–0,81)

^а Данные взяты из [14] ^б каталитическая константа; ^в константа ассоциации альдегида; ^г показатель степенной зависимости константы связывания восстановленного флавина от вязкости среды; ^д в скобках указаны значения r для энергии, делённой на количество молекул осмолита в системе.

Сравнение эффектов осмолитов на две высоко гомологичные люциферазы показало, что люцифераза *V. harveyi* сохраняет свою большую компактность, чем *P. leiognathi* в присутствии всех рассмотренных осмолитов. Но в целом, значительных различий структурно-динамических характеристиках изучаемых люцифераз отмечено не было.

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

4.1 Механизмы температурных эффектов на бактериальные люциферазы

В работе [166] было экспериментально исследовано функционирование при разных температурах и термостабильность двух бактериальных люцифераз, из *V. harveyi* и *P. leiognathi*, в буфере и в присутствии 30%-ной сахарозы (Рисунок 4.1).

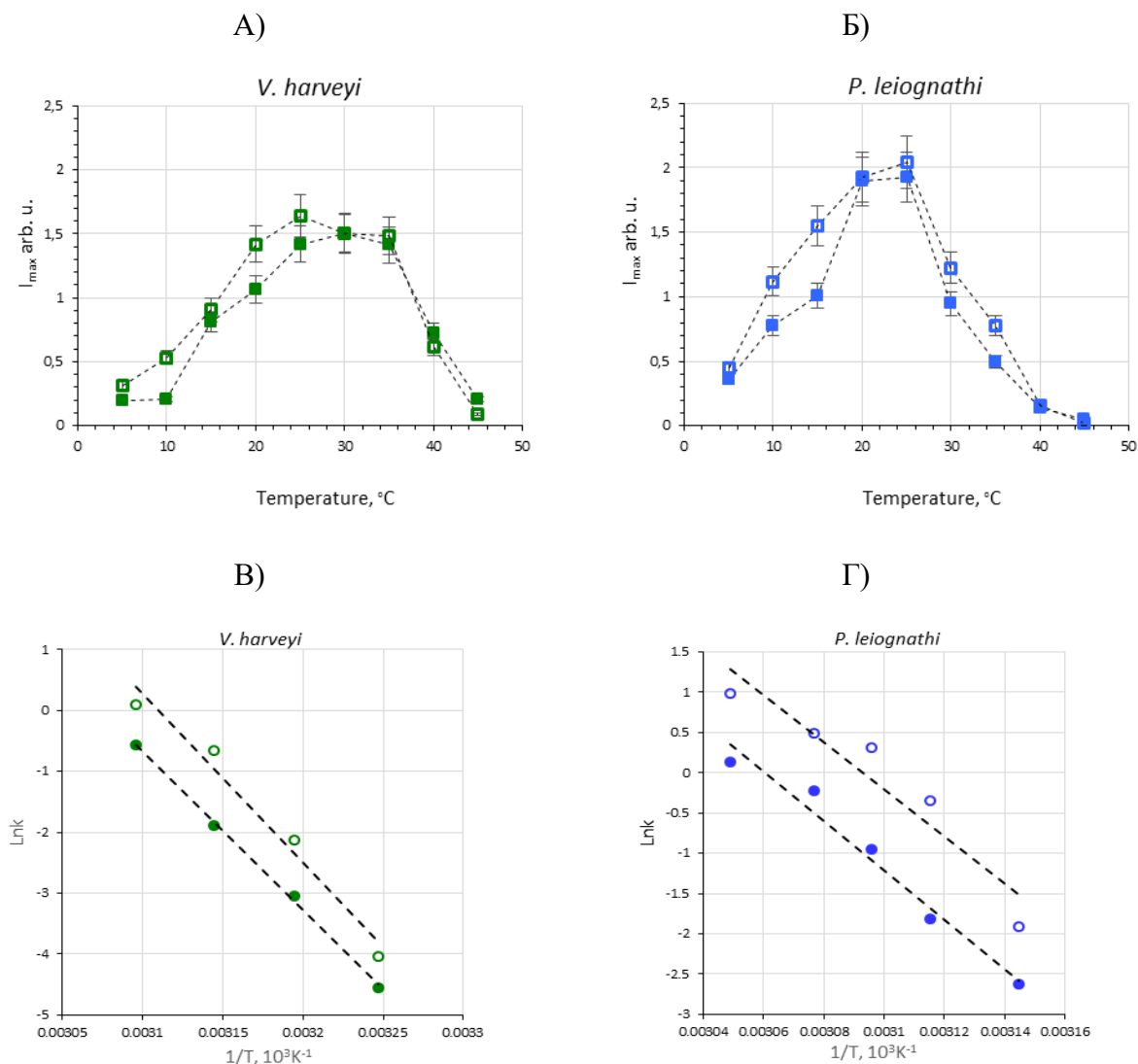


Рисунок 4.1 – Влияние сахарозы на функционирование и стабильность бактериальных люцифераз при разных температурах: максимальная интенсивность биOLUMИнесценции (А, Б) и скорость термоинактивации (в координатах Аррениуса) (В, Г) для реакции, катализируемой люциферазой *V. harveyi* (А, В) и *P. leiognathi* (Б, Г) в буфере (незаполненные маркеры) и в присутствии 30%-ной сахарозы (закрашенные маркеры). Взято из [166].

Результаты показали, что «быстрая» люцифераза *P. leiognathi* термолabileна, она обладает максимальной активностью в более узком интервале температур, чем «медленная» люцифераза *V. harveyi* (Рисунок 4.1, А и Б). Последняя слабо чувствительна к изменению температуры и сохраняет активность до 35 °С. Однако в оптимальных условиях люцифераза *P. leiognathi* обеспечивает вдвое больший общий квантовый выход за один оборот фермента. Люцифераза *P. leiognathi* также показала более высокую скорость термоинактивации и более низкую температуру плавления, определённую методом дифференциальной сканирующей калориметрии. При этом вязкая среда (раствор 30%-ной сахарозы) не дает преимуществ для функционирования бактериальных люцифераз ни при повышенных (35–45 °С), ни при пониженных (5–15 °С) температурах (Рисунок 4.1, А и Б), но значительно снижает скорость термоинактивации ферментов (Рисунок 4.1, В и Г). Механизмы влияния сахаров на структурно-динамические характеристики бактериальных люцифераз, приводящие к разным наблюдаемым эффектам при вариации температуры, могут быть прояснены с помощью методов молекулярного моделирования.

Для выяснения механизмов был проведен расчет молекулярной динамики (100 нс) бактериальных люцифераз *V. harveyi* и *P. leiognathi* в окружении молекул воды при различных температурах (5, 15, 27, 45 и 60 °С). Для двух температур, 27 и 60 °С, была промоделирована динамика люцифераз в окружении смеси воды с молекулами сахарозы (30 вес.%).

Влияние температуры на укладку белковых глобул оценивали по следующим параметрам: среднеквадратичное отклонение положения C_{α} -атомов (RMSD), радиус инерции, рассчитанный по всем атомам белка, (R_g) и площадь поверхности, доступная растворителю (SASA). Результаты представлены в таблице 4.1.

Существенного изменения значений параметров RMSD и R_g для обоих ферментов с повышением температуры обнаружено не было. Однако, значения RMSD для люциферазы *V. harveyi* ниже, чем у *P. leiognathi* (1,6–2,3 Å против 1,9–2,6 Å соответственно). В то же время, при 60 °С стандартное отклонение RMSD люциферазы *V. harveyi* оказалось меньше, чем у фермента *P. leiognathi*. Это говорит о меньшей флуктуации структуры люциферазы *V. harveyi* относительно среднего изменения при высоких температурах. Стоит отметить, что при высокой температуре присутствие сахарозы уменьшало стандартное отклонение значений SASA для люциферазы *V. harveyi*, в то время как для фермента *P. leiognathi* такого эффекта не наблюдалось.

Таблица 4.1 – Структурные параметры люцифераз *V. harveyi* (*V. h.*) и *P. leiognathi* (*P. l.*) при различных температурах: среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи (RMSD), радиус инерции (R_g) и площадь поверхности, доступной растворителю (SASA).

Параметр*	Люци- фераза	Температура						
		5 °C	15 °C	27 °C		45 °C	60 °C	
		Вода	Вода	Вода	Сахароза 30%	Вода	Вода	Сахароза 30%
RMSD, Å	<i>V. h.</i>	1,7±0,2	1,8±0,1	1,7±0,1	1,6±0,2	2,2±0,1	2,3±0,3	2,1±0,3
	<i>P. l.</i>	2,2±0,2	2,2±0,2	2,2±0,2	1,9±0,2	2,6±0,2	2,6±0,5	2,4±0,2
R_g , Å	<i>V. h.</i>	26,6±0,1	26,6±0,1	26,7±0,1	26,7±0,1	26,8±0,1	26,8±0,1	26,7±0,1
	<i>P. l.</i>	27,0±0,1	27,1±0,2	26,8±0,1	27,0±0,1	27,1±0,1	27,1±0,2	27,2±0,2
SASA×100 Å ²	<i>V. h.</i>	287±5	284±4	286±4	287±4	288±5	290±7	286±4
	<i>P. l.</i>	298±4	300±12	293±5	294±3	295±6	297±7	301±8

* рассчитано для последних 10 нс МД-траекторий в виде среднее значение ± стандартное отклонение по трем повторностям.

Также были рассчитаны среднеквадратичные флуктуация (RMSF) C_α -атомов люцифераз для оценки подвижности структурных сегментов при различных температурах. Изменение подвижности относительно контроля (вода, 27 °C) оценивали как $\Delta RMSF = RMSF_T - RMSF_{27^\circ C}$, где $RMSF_T$ – параметр C_α -атома при температуре T, $RMSF_{27^\circ C}$ – параметр при 27 °C в воде. Результаты такой оценки для α -субъединиц люцифераз приведены на рисунке 4.2. Получено, что подавляющая часть основной цепи обеих субъединиц ферментов не изменяет своей подвижности с вариацией температуры ($\Delta RMSF < 0,5$ Å). Однако высокая температура оказывает влияние на подвижность мобильной петли люцифераз, расположенной на участке приблизительно $\alpha 260$ - $\alpha 290$ (Рисунок 4.2, А, Б). При 60 °C $\Delta RMSF > 1,5$ Å для обеих люцифераз на этом участке. Кроме того, у люциферазы *V. harveyi* чувствительным к повышению температуры участком оказался $\alpha 146$ - $\alpha 152$ (Рисунок 4.2, А). Присутствие сахарозы (30%) при 27 °C не оказывает влияния на подвижность остова α -субъединиц люцифераз, но при 60 °C снижает флуктуации мобильной петли до уровня контроля (Рисунок 4.2, В, Г).

Более детально изменения $\Delta RMSF$ для мобильной петли показаны на рисунке 4.3.

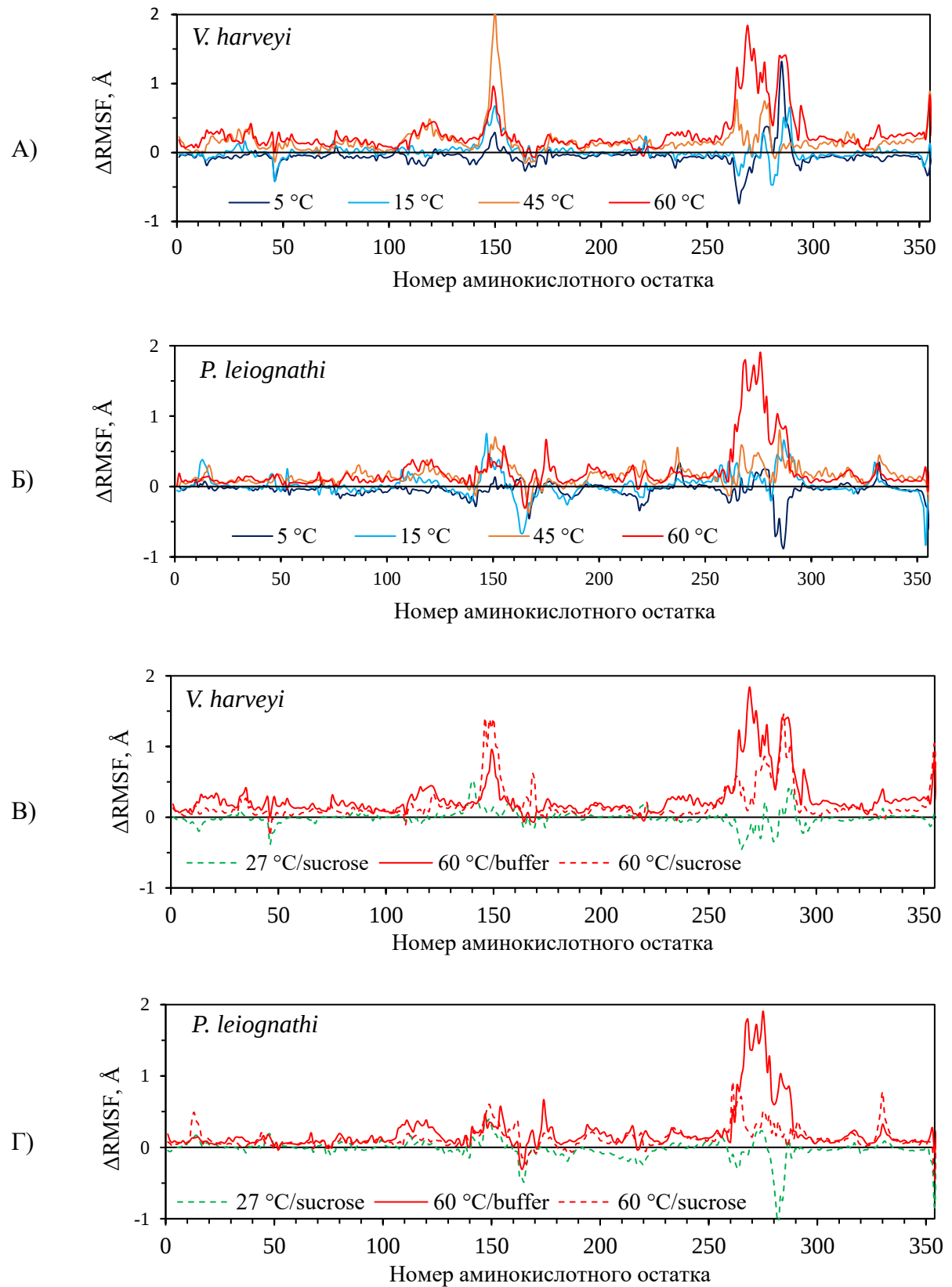


Рисунок 4.2 – ΔRMSF C_α -атомов α -субъединиц люцифераз *V. harveyi* (А, В) и *P. leiognathi* (В, Г) при различных температурах в воде (А, В) и в присутствии сахарозы (30%) (Б, Г). $\Delta\text{RMSF} = \text{RMSF}_T - \text{RMSF}_{27^\circ\text{C}}$, где RMSF_T – параметр C_α -атома при температуре T , $\text{RMSF}_{27^\circ\text{C}}$ – параметр при 27°C в воде.

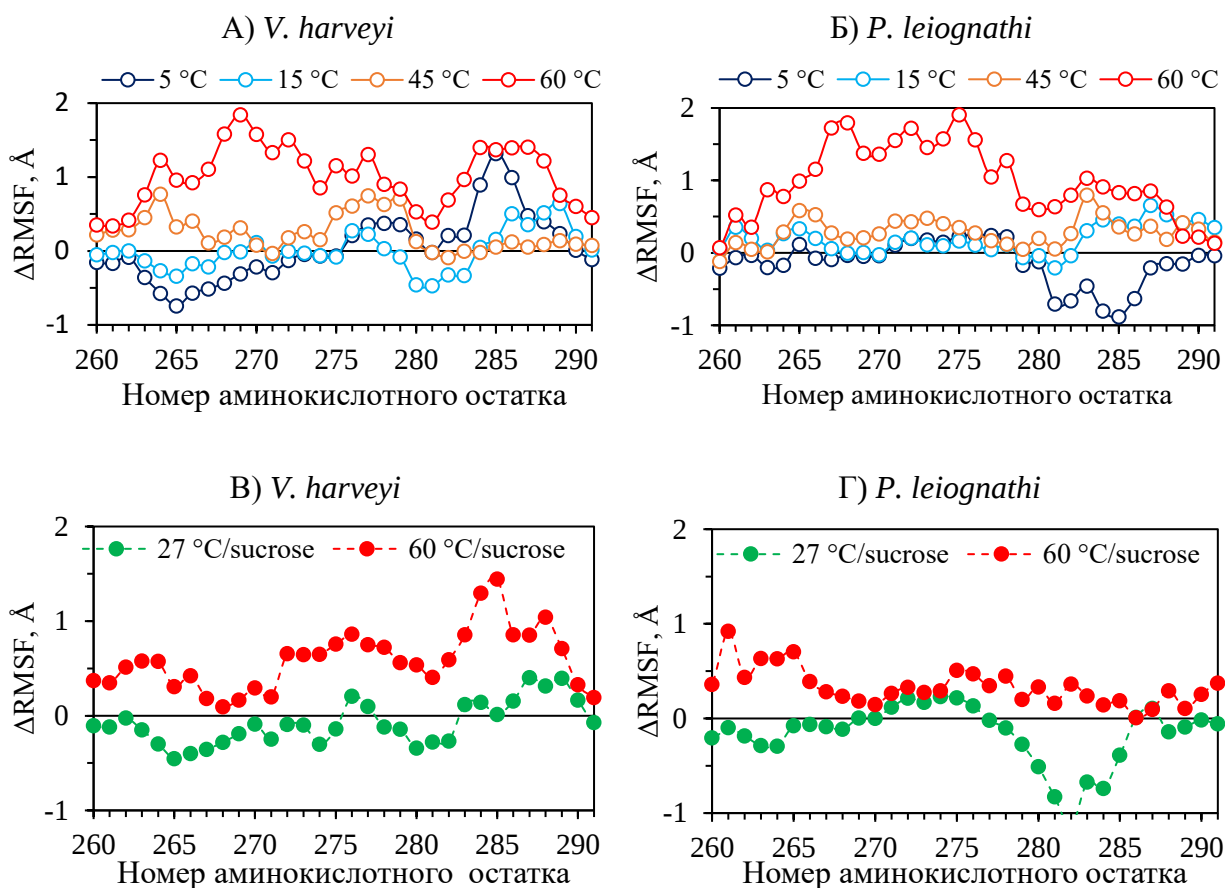
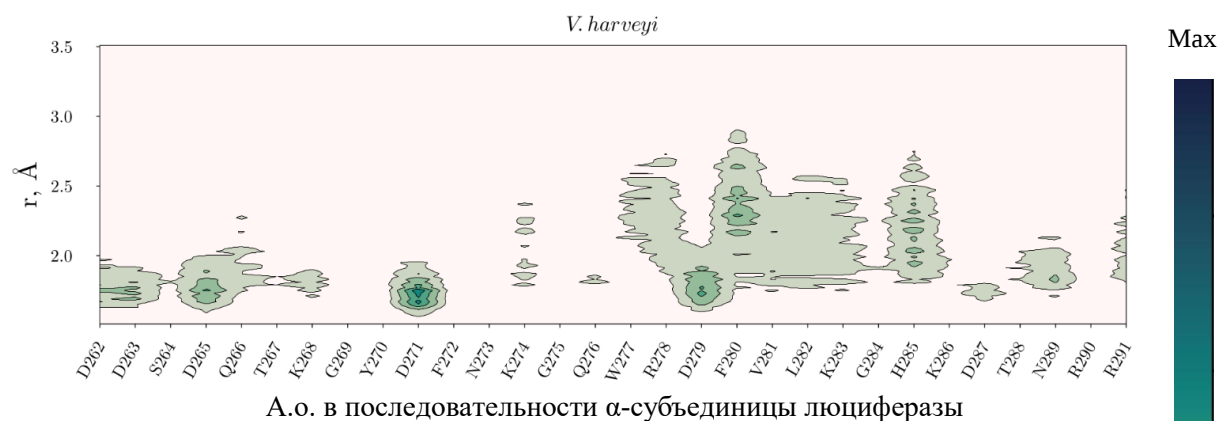


Рисунок 4.3 – Δ RMSF C $_{\alpha}$ -атомов мобильной петли люциферазы *V. harveyi* (А, В) и *P. leiognathi* (Б, Г) при разной температуре в окружении молекул воды (А, Б) и смеси воды с сахарозой (39%) (В, Г).

По рисунку 4.3 А, Б видно, как при высокой температуре увеличивается подвижность участка мобильная петли люцифераз: при 60 °C Δ RMSF принимает значения до 2 Å. Добавление сахарозы стабилизирует этот сегмент структуры (4.3 В, Г). Эффект стабилизации более выражен для люциферазы *P. leiognathi*: подвижность мобильной петли при 60 °C в присутствии сахарозы становится близким к уровню, наблюдаемому в воде при 27 °C, параметр Δ RMSF близок к нулю (Рисунок 4.3. В).

Разницу между двумя люциферазами можно объяснить с помощью функции распределения минимального расстояния (MDDF) [125]. На основе MDDF были построены двумерные карты плотности появления молекул сахарозы на расстоянии 1,5–3,5 Å от аминокислотных остатков мобильной петли (Рисунок 4.4). Видно, 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.

А)



Б)

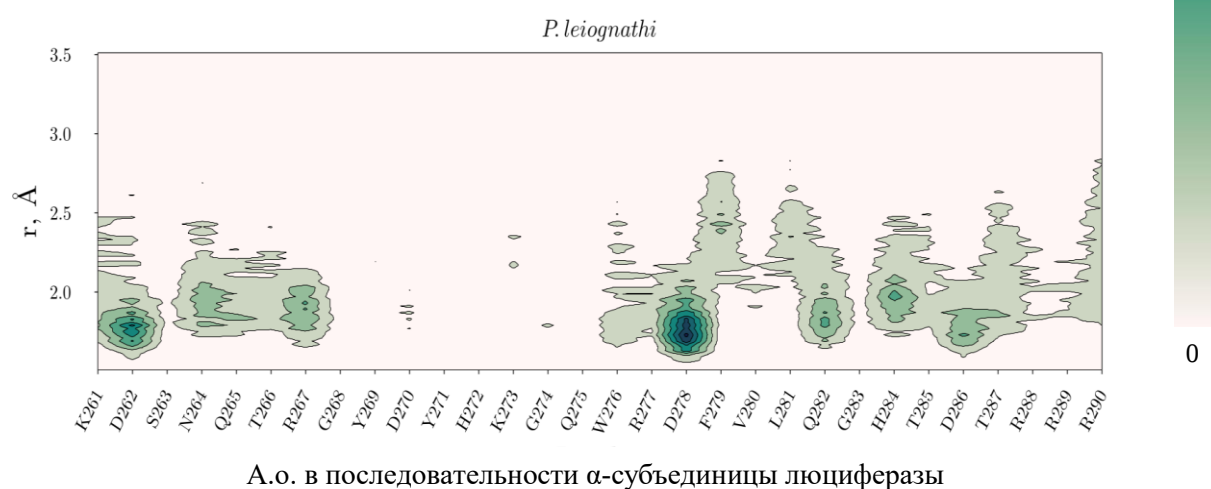


Рисунок 4.4 – Двухмерное представление распределения минимального расстояния молекул сахарозы (MDDF) до аминокислотных остатков мобильной петли люциферазы *V. harveyi* (А) и *P. leiognathi* (Б) при 60 °С.

Следует отметить, что участок мобильной петли функционально важен для протекания биolumинесцентной реакции бактериальных люцифераз. Стабилизация этого участка при высокой температуре в присутствии сахарозы может быть одним из механизмов наблюдаемого в эксперименте снижения скорости термоинактивации люцифераз [166].

4.2 Взаимодействие осмолитов с субстратами биolumинесцентной системы бактерий

Одним из возможных механизмов воздействия осмолитов на эффективность протекания ферментативных реакций является их специфическое взаимодействие с субстратами/лигандами ферментов. Такие специфические взаимодействия с компонентами среды, как образование водородных связей, могут иметь значительные биохимические последствия, снижая скорость образования фермент-субстратного комплекса за счет изменения

гидродинамического объема молекул, их конформационного состояния, электростатического потенциала поверхности и др. [167]. Так, для реакции, катализируемой NADPH:FMN-оксидоредуктазой светящихся бактерий *V. fischeri*, было зарегистрировано снижение скорости катализа в средах с глицерином и сахарозой, которое определялось не вязкостью среды, а другими факторами [168]. Более детальный анализ показал, что в присутствии глицерина снижается константа Михаэлиса фермента по отношению к FMN и его максимальная скорость, в то время как в среде с сахарозой такого не происходит. Полученные авторами спектроскопические данные выявили, что сдвиги спектров поглощения субстратов оксидоредуктазы NADH и FMN не могут быть объяснены меньшей полярностью сред с глицерином и сахарозой, по сравнению с буфером, а значит вероятно наличие специфических взаимодействий между субстратами реакции и осмолитами. Для прояснения этого вопроса были привлечены методы молекулярной динамики, позволяющие на атомном уровне проанализировать возможность образования водородных связей между нуклеотидами и окружением.

Было проведено моделирование молекулярной динамики NADH и FMN в окружении молекул воды и смесей воды с глицерином и сахарозой (соответствующих концентрации 40 вес.%). По полученным 100-наносекундным МД-траекториям была вычислена заселённость водородных связей между полярными атомами нуклеотидов и молекулами воды или осмолита (см. детали в разделе 2.4). Результаты вычислений представлены на рисунках 4.5-4.6.

Для изоаллоксазинового кольца FMN, на котором происходит окислительно-восстановительная реакция в активном центре ферментов, было получено, что атомы O2, N3 и O4 чаще образуют водородные связи с водой и/или с осмолитом, чем атомы N1 и N5 (Рисунок 4.5). Присутствие глицерина или сахарозы уменьшает количество водородных связей с водой, что наиболее ярко выражено для N3. Также было обнаружено, что атомы кислорода фосфатной группы FMN хорошо доступны для образования водородных связей с водой и глицерином, такая связь присутствует на протяжении всего времени моделирования. Выявлено, что молекулы глицерина могут выступать донорами водородных связей для фосфатной группы одновременно с водой, тогда как сахароза не способна делать также и мало взаимодействует с фосфатной группой.

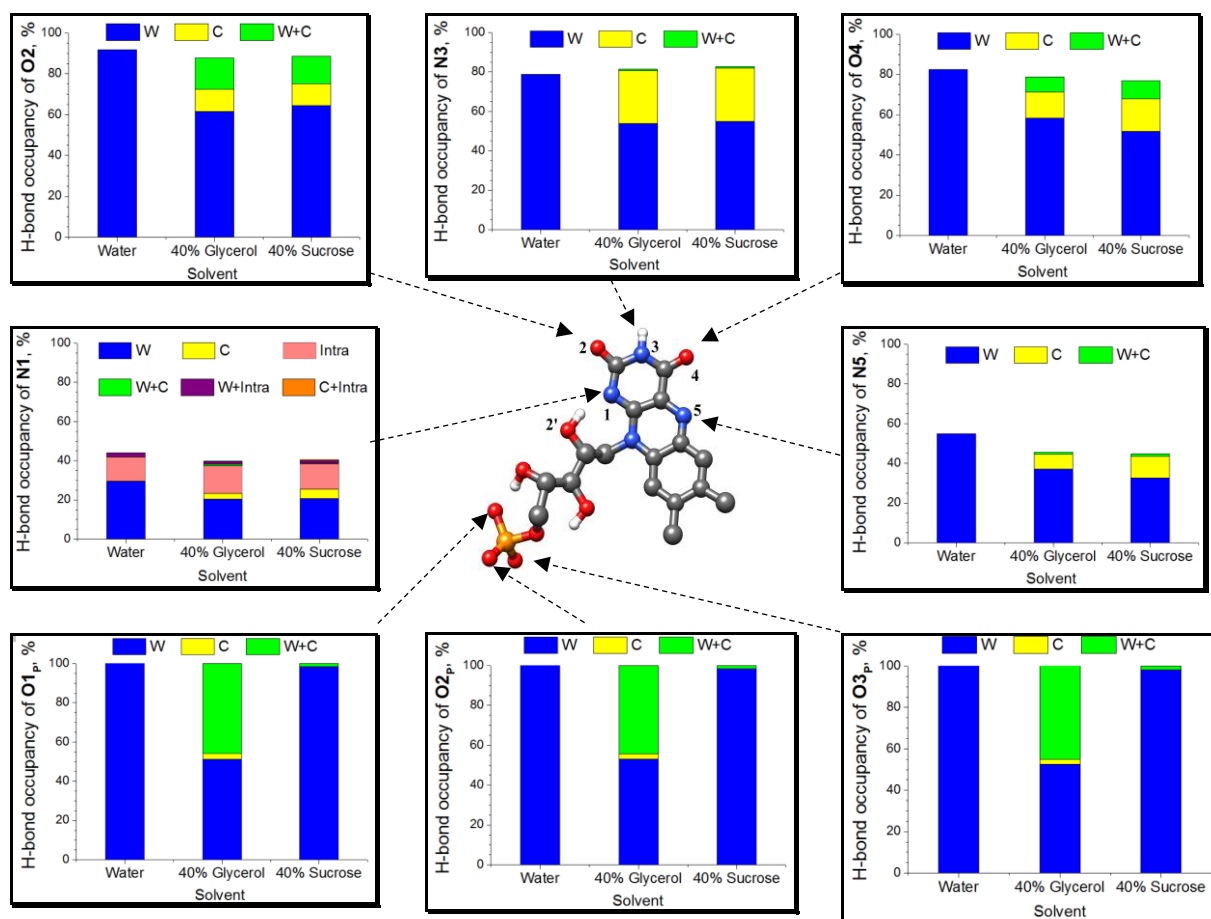


Рисунок 4.5 – Суммарная заселенность водородных связей гетероатомов FMN в воде и присутствии 40% глицерина либо сахарозы. Разные цвета обозначают вклады связей с разными партнёрами: W – вода (синий), C – только соразтворитель (желтый), W+C – и вода, и соразтворитель одновременно (зелёный). Intra (розовый) – внутримолекулярная связь между атомами N1 и O2' (рибитильной группы). C+Intra/W+Intra (фиолетовый) – учитывает одновременно вклады внутримолекулярная связей в FMN с осмолитом/водой соответственно. FMN представлен в центре в виде шаростержневой модели (атомы кислорода – красным, азота – синим, водорода – белым и фосфора – оранжевым).

Молекула NADH больше, чем FMN, и содержит 21 гетероатом, которые потенциально могут участвовать в образовании водородных связей с растворителем. Заселенность важных для спектра поглощения атомов этого нуклеотида показана на рисунке 4.6. Обнаружено, что O7N образует устойчивую водородную связь с водой, а молекулы осмолитов снижают вероятность ее образования на 10–15%. Амидная группа (N7H1/H2) участвует реже во взаимодействии с водой или осмолитом (заселённость <50%). Для фосфатных групп NADH выявлены те же закономерности, что и для фосфатной группы FMN. Так, атомы O1A, O2A, O1N и O2N всегда образуют водородные связи с водой (100% времени МД). В то же время глицерин имеет значительный больший доступ к этой группе

атомов, чем сахароза. Это хорошо согласуется с результатами, полученными ранее для молекулы АТФ [169].

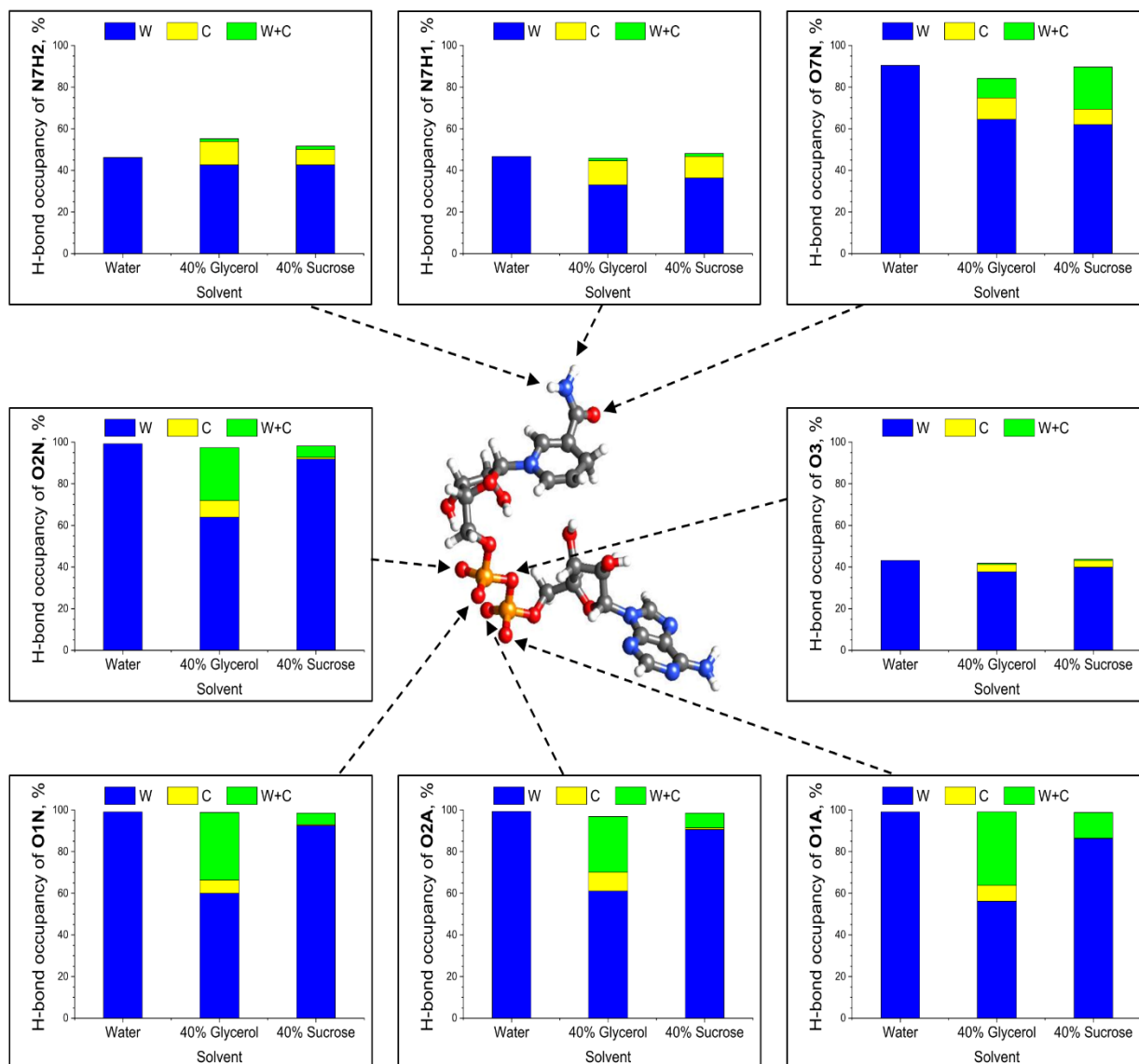


Рисунок 4.6 – Суммарная заселенность водородных связей гетероатомов NADH в воде в присутствии 40% глицерина/сахарозы. Разные цвета обозначают вклады связей с разными партнёрами: W – вода (синий), C – только соразтворитель (желтый), W+C – вода и соразтворитель одновременно (зелёный). NADH показан в центре в виде шариковой модели (атомы кислорода – красным, азота – синим, водорода – белым и фосфора – оранжевым).

Таким образом, молекулярное моделирование показало, 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 фламина, участвующего в окислительно-восстановительных процессах в биolumинесцентных

и других реакциях, повышается за счет взаимодействия воды с другими гетероатомами изоаллоксазинового кольца, кроме N3 [170]. 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 количества водородных связей между водой и N3 уменьшается (Рисунок 4.5).

Также результаты молекулярного моделирования показывают, что фосфатная группа обоих нуклеотидов вероятнее образует связь с молекулами глицерина, чем с сахарозой. Это может быть связано со стерическими ограничениями, поскольку молекула сахарозы примерно в четыре раза больше молекулы глицерина. Водородные связи глицерина с фосфатными группами FMN и NADH могут влиять на скорость диффузии этих субстратов в водно-глицериновых растворах, что, в свою очередь, влияет на зависимость скорости реакции от вязкости среды. Более того, известно, что фосфатная группа обоих нуклеотидов играет роль в связывании флавинов белками, в том числе и бактериальной люциферазой [134, 171]. Хотя эта группа атомов у FMN и NADH, вероятно, связывается с NADPH:FMN-оксидоредуктазой вне активного центра, это связывание с заряженными аминокислотными остатками белка за счет довольно сильных электростатических взаимодействий способствует правильной координации субстрата в активном центре. 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.

Анализ распределения молекул глицерина и сахарозы в сольватной оболочке FMN (с помощью вычисления функции распределения минимального расстояния MDDF) выявил новую особенность взаимодействия молекул осмолитов с этим важным биологическим метаболитом. Получено, что сахароза присутствует в гидратном слое изоаллоксазинового кольца флавина в течение 50-90% времени (Рисунок 4.7), хотя и не образует значительного числа водородных связей с гетероатомами этой структуры (Рисунок 4.5). Для глицерина такого противоречия нет: он присутствует на близком расстоянии от фосфатной группы флавина большую часть времени моделирования и образует значительное число водородных связей с кислородами этой группы. Стоит отметить, что независимо от механизма, за счет которого молекула осмолита удерживается на близком расстоянии от функционально важных групп субстратов ферментативных реакций, этот факт может влиять на эффективность процессов, в которых участвует этот субстрат/метаболит.

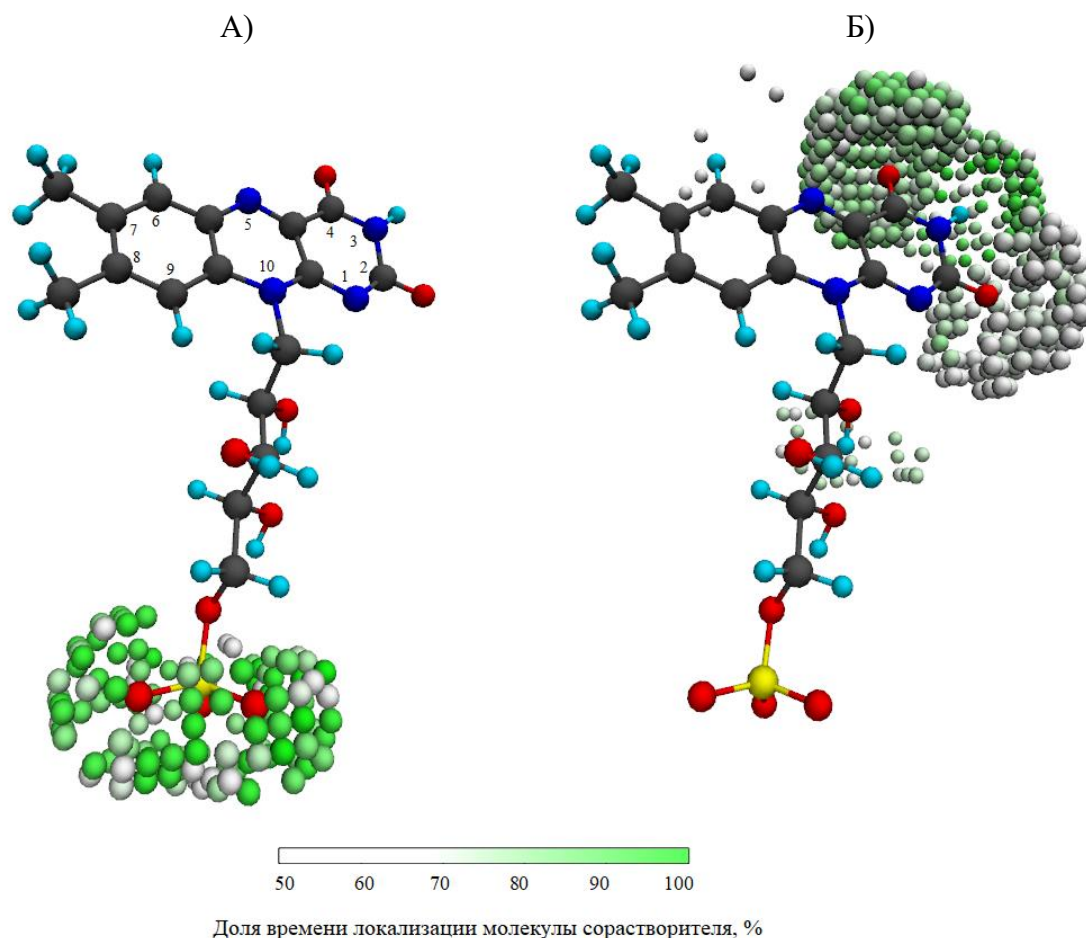


Рисунок 4.7 – Распределение молекул глицерина (А) и сахарозы (Б) в первой сольватной оболочке FMN (на расстоянии 1,5-3,5 Å) за время молекулярной динамики (100 нс). Шары градиентной расцветки отражают зоны первой сольватной оболочки, где молекулы соразтворителя находились в течение >50% времени моделирования. FMN изображён в виде шаро-стержневой модели (серым цветом выделены атомы С, цианом – Н, синим – N, красным – О, желтым – Р). На (А) указана нумерация атомов изоаллоксазиноого кольца FMN [167].

Сопоставление результатов молекулярного моделирования с экспериментальными данными о скорости реакции, катализируемой NADPH:FMN-оксидоредуктазой светящихся бактерий *V. fischeri*, позволило предположить, что более низкая полярность вокруг изоаллоксазинового кольца флавина усиливает фермент-субстратное взаимодействие (в случае сахарозы), тогда как водородные связи рибитилфосфатного хвоста с более крупными, чем вода, молекулами замедляет связывание флавина в активном центре редуктазы (в случае глицерина). Стоит отметить, что знания о путях улучшения субстратной специфичности NADPH:FMN-оксидоредуктазы *V. fischeri* имеют большое значение в свете возможного

применения этого фермента в противораковой пролекарственной терапии [172, 173]. Наше исследование показало, что факторами, регулирующими активность этого фермента, могут быть не только структура белка, но и свойства микроокружения.

Для ответа на вопрос, насколько универсальны найденные особенности взаимодействия глицерина и сахарозы с FMN и NADH для других осмолитов (полиолов и сахаров), требуются дальнейшие исследования.

4.3 Заключение к главе

С помощью метода молекулярной динамики было исследовано влияние факторов температуры и среды на структурно-динамические характеристики компонентов биolumинесцентной системы бактерий. Анализ структуры люцифераз *V. harveyi* и *P. leiognathi* показал, 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. Было получено, что присутствие сахарозы в окружении (40%) стабилизирует этот сегмент структуры люцифераз, причем для *P. leiognathi* этот эффект выражен ярче. 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.

Также было проведено молекулярное моделирование важных метаболитов, FMN и NADH, для выявления их специфических взаимодействий с двумя осмопротекторами: глицерином и сахарозой. Результаты показали, атомы кислорода фосфатных и карбоксильных групп наиболее доступны для образования водородных связей с молекулами окружения (водородная связь фиксируется в течение 80–100% времени моделирования). В то же время, оба осмолита могут как вытеснять воду, так и, для некоторых атомов, участвовать в образовании множественных водородных связей одновременно вместе с ней. Изменение сети водородных связей молекул растворителя/соразтворителя с никотинамидным и изоаллоксазинным частями NADH и FMN соответственно согласуется с наблюдаемыми в экспериментальных исследованиях батохромными сдвигами первых полос поглощения этих нуклеотидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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, полученных 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 присутствия 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 биолюминесцентной системе бактерий.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

DHF – дигидрофолат

DHFR – дигидрофолатредуктаза

EcDHFR – дигидрофолатредуктаза *E. coli*

FMN – флавиномононуклеотид

FMNH₂ – восстановленная форма флавиномононуклеотида

IUPAC-IUB – Международный союз теоретической и прикладной химии - Международный союз биохимии

LEA-белки – белки позднего эмбриогенеза

MDDF – функция распределения минимального расстояния (англ. *minimum-distance distribution function*)

NAD(P) – никотинамидадениндинуклеотид фосфат

NADH – никотинамидадениндинуклеотид в восстановленной форме

NPT-ансамбль – изобарический – изотермический ансамбль, в котором число частиц, давление и температура остаются постоянными

NTD – N-концевой домен андрогенового рецептора

NVT-ансамбль – канонический ансамбль, в котором число частиц, объем и температура остаются постоянными

P. l. – *Photobacterium leiognathi*

PDB – банк данных белковых структур

PDB ID – идентификатор банка данных белковых структур

RCHO – альдегид

RCOOH – карбоновая кислота

R_g – радиус инерции

RMSD – среднеквадратичное отклонение положений атомов

RMSF – среднеквадратичная флуктуация

RNase-A (РНКаза-A) – рибонуклеаза А

SASA – площадь поверхности, доступной растворителю

V. h. – *Vibrio harveyi*

a. o. – аминокислотный остаток

АлДГ – альдегид дегидрогеназа

Крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия

МД – молекулярная динамика

ТМАО – триметиламиноксид

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yancey P. H. Living with water stress: evolution of osmolyte systems / P. H. Yancey, M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus, G. N. Somero // *Science*. – 1982. – Т. 217. – №. 4566. – С. 1214-1222.
2. Ruckenstein E. Effect of salts and organic additives on the solubility of proteins in aqueous solutions / E. Ruckenstein, I. L. Shulgin // *Advances in colloid and interface science*. – 2006. – Т. 123. – С. 97-103.
3. Фонин А. В. Фолдинг и стабильность белка в присутствии осмолитов / А. В. Фонин, В. Н. Уверский, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов // *Биофизика*. – 2016. – Т. 61. – №. 2. – С. 222-230.
4. Street T. O. A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability / T. O. Street, D. W. Bolen, G. D. Rose // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Т. 103. – №. 38. – С. 13997-14002.
5. Richards F. M. Linkage thermodynamics of macromolecular interactions/ F. M. Richards, D. S. Eisenberg, P. S. Kim, E. Di Cera // *Advances in protein chemistry*. – Academic Press. – 1998
6. Rösgen J. Protein folding, stability, and solvation structure in osmolyte solutions / J. Rösgen, B. M. Pettitt, D. W. Bolen // *Biophysical journal*. – 2005. – Т. 89. – №. 5. – С. 2988-2997.
7. Tah I. How does a hydrophobic macromolecule respond to a mixed osmolyte environment? / I. Tah, J. Mondal // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2016. – Т. 120. – №. 42. – С. 10969-10978.
8. Holthauzen L. M. F. Protein stability in the presence of cosolutes / L. M. F. Holthauzen, M. Auton, M. Sinev, J. Rösgen // *Methods in Enzymology*. – Academic Press. – 2011. – Т. 492. – С. 61-125.
9. Yancey P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses / P. H. Yancey // *Journal of experimental biology*. – 2005. – Т. 208. – №. 15. – С. 2819-2830.
10. Jamal S. Relationship between functional activity and protein stability in the presence of all classes of stabilizing osmolytes / S. Jamal, N. K. Poddar, L. R. Singh, T. A. Dar, V. Rishi, F. Ahmad // *The FEBS journal*. – 2009. – Т. 276. – №. 20. – С. 6024-6032.
11. Esimbekova E. N. Bioluminescent enzyme inhibition-based assay to predict the potential toxicity of carbon nanomaterials / E. N. Esimbekova, E. V. Nemtseva, A. E. Bezrukikh, G.

V. Jukova, A. E. Lisitsa, V. I. Lonshakova-Mukina, N. V. Rimatskaya, O. S. Sutormin, V. A. Kratasyuk // *Toxicology in Vitro*. – 2017. – T. 45. – C. 128-133.

12. Rozhko T. V. Enzymatic responses to low-intensity radiation of tritium / T. V. Rozhko, E. V. Nemtseva, M. V. Gardt, A. V. Raikov, A. E. Lisitsa, G. A. Badun, N. S. Kudryasheva // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – T. 21. – №. 22. – C. 8464.

13. Lisitsa A. E. Mechanisms of viscous media effects on elementary steps of bacterial bioluminescent reaction / A. E. Lisitsa, L. A. Sukovaty, S. I. Bartsev, A. A. Deeva, V. A. Kratasyuk, E. V. Nemtseva // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – T. 22. – №. 16. – C. 8827

14. Lisitsa A. E. The Role of Cosolvent–Water Interactions in Effects of the Media on Functionality of Enzymes: A Case Study of *Photobacterium leiognathi* Luciferase / A. E. Lisitsa, L. A. Sukovaty, A. A. Deeva, D. V. Gulnov, E. N. Esimbekova, V. A. Kratasyuk, E. V. Nemtseva // *Life*. – 2023. – T. 13. – №. 6. – C. 1384.

15. Politi R. The impact of polyols on water structure in solution: a computational study / R. Politi, L. Sapir, D. Harries // *The journal of physical chemistry A*. – 2009. – T. 113. – №. 26. – C. 7548-7555.

16. Gazi R. Conformational Features and Hydration Dynamics of Proteins in Cosolvents: A Perspective from Computational Approaches / R. Gazi, S. Maity, M. Jana // *Acs Omega*. – 2023. – T. 8. – №. 3. – C. 2832-2843.

17. Adamczak B. et al. Molecular basis of the osmolyte effect on protein stability: a lesson from the mechanical unfolding of lysozyme / B. Adamczak, M. Wierzchowski, M. Kogut, J. Stangret, J. Czub // *Biochemical Journal*. – 2016. – T. 473. – №. 20. – C. 3705-3724.

18. Hishida M. Effect of osmolytes on water mobility correlates with their stabilizing effect on proteins / M. Hishida, R. Anjum, T. Anada, D. Murakami, M. Tanaka // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2022. – T. 126. – №. 13. – C. 2466-2475.

19. Bolen D. W. Protein stabilization by naturally occurring osmolytes / D. W. Bolen // *Protein structure, stability, and folding*. – 2001. – C. 17-36.

20. Rösgen J. Molecular basis of osmolyte effects on protein and metabolites / J. Rösgen // *Methods in enzymology*. – 2007. – T. 428. – C. 459-486.

21. Harries D. A practical guide on how osmolytes modulate macromolecular properties / D. Harries, J. Rösgen // *Methods in cell biology*. – 2008. – T. 84. – C. 679-735.

22. Hochachka P. W. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution / P. W. Hochachka, G. N. Somero // Oxford university press. — 2002.

23. Oren A. Life at high salt concentrations / A. Oren // *The prokaryotes*. – 2006. – T. 3. – C. 263-282.

24. Pourmozaffar S. The role of salinity in physiological responses of bivalves / S. Pourmozaffar, S. Tamadoni Jahromi, H. Rameshi, A. Sadeghi, T. Bagheri, S. Behzadi, M. Gozari, M. Reza Zahedi, S. Abrari Lazarjani // *Reviews in Aquaculture*. – 2020. – T. 12. – №. 3. – C. 1548-1566.
25. Galinski E. A. Osmoadaptation in bacteria / E. A. Galinski // *Advances in microbial physiology*. – 1995. – T. 37. – C. 273-328.
26. Carpenter J. F. Modes of stabilization of a protein by organic solutes during desiccation / J. F. Carpenter, J. H. Crowe // *Cryobiology*. – 1988. – T. 25. – №. 5. – C. 459-470.
27. Stasiulewicz M. Mechanism of Osmolyte Stabilization–Destabilization of Proteins: Experimental Evidence / M. Stasiulewicz, A. Panuszko, P. Bruździak, J. Stangret // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2022. – T. 126. – №. 16. – C. 2990-2999.
28. Timasheff S. N. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated / S. N. Timasheff // *Adv. Protein Chem.* – 1998. – T. 51. – №. 51. – C. 355-432.
29. Vagenende V. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol / V. Vagenende, M. G. S. Yap, B. L. Trout // *Biochemistry*. – 2009. – T. 48. – №. 46. – C. 11084-11096.
30. Ali F. et. al. Effect of polyol osmolytes on the structure-function integrity and aggregation propensity of catalase: A comprehensive study based on spectroscopic and molecular dynamic simulation measurements / F. Ali, U. Manzoor, F. I. Khan, D. Lai, M. K. A. Khan, K. S. Chandrashekharaiyah, L. R. Singh, T. A. Dar // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2022. – T. 209. – C. 198-210.
31. Macchi F. The effect of osmolytes on protein fibrillation / F. Macchi, M. Eisenkolb, H. Kiefer, D. E. Otzen // *International journal of molecular sciences*. – 2012. – T. 13. – №. 3. – C. 3801-3819.
32. Gadda G. Kinetic solvent viscosity effects as probes for studying the mechanisms of enzyme action / G. Gadda, P. Sobrado // *Biochemistry*. – 2018. – T. 57. – №. 25. – C. 3445-3453.
33. Wong C. H. Enzymatic catalysts in organic synthesis / C. H. Wong // *Science*. – 1989. – T. 244. – №. 4909. – C. 1145-1152
34. Mehrnejad F. Effects of osmolytes on the helical conformation of model peptide: molecular dynamics simulation / F. Mehrnejad, M. M. Ghahremanpour, M. Khadem-Maaref, F. Doustdar // *The Journal of Chemical Physics*. – 2011. – T. 134. – №. 3.
35. Stepankova V. Expansion of Access Tunnels and Active-Site Cavities Influence Activity of Haloalkane Dehalogenases in Organic Cosolvents / V. Stepankova, M. Khabiri, J.

Brezovsky, A. Pavelka, J. Sykora, M. Amaro, J. Damborsky // *ChemBioChem*. – 2013. – T. 14. – №. 7. – C. 890-897

36. Minton A. P. The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media / A. P. Minton // *Journal of biological chemistry*. – 2001. – T. 276. – №. 14. – C. 10577-10580.

37. Samsonov S. A molecular dynamics approach to study the importance of solvent in protein interactions / S. Samsonov, J. Teyra, M. T. Pisabarro // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*

38. Lin M. G. Catalytic activity and structural stability of three different *Bacillus* enzymes in water/organic co-solvent mixtures / M. G. Lin, T. F. Wang, Y. Y. Chen, M. C. Chi, L. L. Lin // *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. – 2016. – T. 59. – C. 126-131.

39. Uribe S. Measuring solution viscosity and its effect on enzyme activity / S. Uribe, J. G. Sampedro // *Biological procedures online*. – 2003. – T. 5. – №. 1. – C. 108-115.

40. Jahan I. Conformational dynamics of superoxide dismutase (SOD1) in osmolytes: a molecular dynamics simulation study / I. Jahan, S. M. Nayeem // *RSC advances*. – 2020. – T. 10. – №. 46. – C. 27598-27614.

41. Orozco M. Theoretical methods for the description of the solvent effect in biomolecular systems / M. Orozco, F. J. Luque // *Chemical Reviews*. – 2000. – T. 100. – №. 11. – C. 4187-4226.

42. Avanti C. Stability of lysozyme in aqueous extremolyte solutions during heat shock and accelerated thermal conditions / C. Avanti, V. Saluja, E. L. Streun, H. W. Frijlink, W. L. Hinrichs // *PLoS One*. – 2014. – T. 9. – №. 1. – C. e86244.

43. Damodaran S. Amino acids, peptides and proteins / S. Damodaran // *Fennema's food chemistry*. – 2008. – T. 4. – C. 425-439.

44. Callender R., Dyer R. B. The dynamical nature of enzymatic catalysis / R. Calendar, R. B. Dyer // *Accounts of chemical research*. – 2015. – T. 48. – №. 2. – C. 407-413.

45. Canchi D. R. Cosolvent effects on protein stability / D. R. Canchi, A. E. García // *Annual review of physical chemistry*. – 2013. – T. 64. – C. 273-293.

46. Paul S. Investigating the counteracting effect of trehalose on urea-induced protein denaturation using molecular dynamics simulation / S. Paul, S. Paul // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2015. – T. 119. – №. 34. – C. 10975-10988.

47. Zewail A. H. Diffraction, crystallography and microscopy beyond three dimensions: structural dynamics in space and time / A. H. Zewail // *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. – 2005. – T. 363. – №. 1827. – C. 315-329.

48. Egli M. Diffraction techniques in structural biology / M. Egli // *Current protocols in nucleic acid chemistry*. – 2016. – T. 65. – №. 1. – C. 7.13. 1-7.13. 41.
49. El Hage K. Implications of short time scale dynamics on long time processes / K. El Hage, S. Brickel, S. Hermelin, G. Gaulier, C. Schmidt, L. Bonacina, M. Meuwly // *Structural Dynamics*. – 2017. – T. 4. – №. 6.
50. Callender R. H. Fast events in protein folding: the time evolution of primary processes / R. H. Callender, R. B. Dyer, R. Gilmanshin, W. H. Woodruff // *Annual review of physical chemistry*. – 1998. – T. 49. – №. 1. – C. 173-202.
51. Verma R. In Silico studies of small molecule interactions with enzymes reveal aspects of catalytic function / R. Verma, K. Mitchell-Koch // *Catalysts*. – 2017. – T. 7. – №. 7. – C. 212.
52. Sharma G. S. Protecting thermodynamic stability of protein: The basic paradigm against stress and unfolded protein response by osmolytes / G. S. Sharma, S. Krishna, S. Khan, T. A. Dar, K. A. Khan, L. R. Singh // *International journal of biological macromolecules*. – 2021. – T. 177. – C. 229-240.
53. Davies P. Consequences of poly-glutamine repeat length for the conformation and folding of the androgen receptor amino-terminal domain / P. Davies, K. Watt, S. M. Kelly, C. Clark, N. C. Price, I. J. McEwan // *J Mol Endocrinol*. – 2008. – T. 41. – №. 5. – C. 301-14.
54. Kim Y. S. Effects of sucrose on conformational equilibria and fluctuations within the native-state ensemble of proteins / Y. S. Kim, L. S. Jones, A. Dong, B. S. Kendrick, B. S. Chang, M. C. Manning, T. W. Randolph, J. F. Carpenter // *Protein Science*. – 2003. – T. 12. – №. 6. – C. 1252-1261.
55. Kumar R. Osmolyte-induced folding enhances tryptic enzyme activity / R. Kumar, J. M. Serrette, E. B. Thompson // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2005. – T. 436. – №. 1. – C. 78-82.
56. Khajehzadeh M. Insight to the molecular mechanisms of the osmolyte effects on mycobacterium tuberculosis pyrazinamidase stability using experimental studies, molecular dynamics simulations, and free energy calculation / M. Khajehzadeh, S. Khaleghnejad, F. Mehrnejad, M. Pazhang, F. Doustdar // *The International Journal of Mycobacteriology*. – 2018. – T. 7. – №. 3. – C. 268-274.
57. Kelly S. M. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function / S. M. Kelly, N. C. Price // *Current protein and peptide science*. – 2000. – T. 1. – №. 4. – C. 349-384.

58. Ratnaparkhi G. S. Osmolytes stabilize ribonuclease S by stabilizing its fragments S protein and S peptide to compact folding-competent states / G. S. Ratnaparkhi, R. Varadarajan // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – T. 276. – №. 31. – C. 28789-28798.
59. Singh R. Counteracting osmolyte trimethylamine N-oxide destabilizes proteins at pH below its pKa: measurements of thermodynamic parameters of proteins in the presence and absence of trimethylamine N-oxide / R. Singh, I. Haque, F. Ahmad // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – T. 280. – №. 12. – C. 11035-11042.
60. Bradbury S. L. Glycerol as an enzyme-stabilizing agent: effects on aldehyde dehydrogenase / S. L. Bradbury, W. B. Jakoby // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1972. – T. 69. – №. 9. – C. 2373-2376.
61. Attri P. Influence of osmolytes and denaturants on the structure and enzyme activity of α -chymotrypsin / P. Attri, P. Venkatesu, M. J. Lee // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2010. – T. 114. – №. 3. – C. 1471-1478.
62. Navarro-Retamal C. Molecular dynamics simulations and CD spectroscopy reveal hydration-induced unfolding of the intrinsically disordered LEA proteins COR15A and COR15B from *Arabidopsis thaliana* / C. Navarro-Retamal, A. Bremer, J. Alzate-Morales, J. Caballero, D. K. Hinch, W. González, A. Thalhammer // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2016. – T. 18. – №. 37. – C. 25806-25816.
63. Tarek M. The role of protein-solvent hydrogen bond dynamics in the structural relaxation of a protein in glycerol versus water / M. Tarek, D. J. Tobias // *European Biophysics Journal*. – 2008. – T. 37. – C. 701-709.
64. Lushchekina S. V. Impact of sucrose as osmolyte on molecular dynamics of mouse acetylcholinesterase / S. V. Lushchekina, G. Inidjel, N. Martinez, P. Masson, M. Trovaslet-Leroy, F. Nachon, J. Peters // *Biomolecules*. – 2020. – T. 10. – №. 12. – C. 1664.
65. Chéron N. Protein preferential solvation in water: Glycerol mixtures / N. Chéron, M. Naepels, E. Pluharova, D. Laage // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2020. – T. 124. – №. 8. – C. 1424-1437.
66. Lerbret A. How do trehalose, maltose, and sucrose influence some structural and dynamical properties of lysozyme? Insight from molecular dynamics simulations / A. Lerbret, P. Bordat, F. Affouard, A. Hédoux, Y. Guinet, M. Descamps // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2007. – T. 111. – №. 31. – C. 9410-9420.
67. Fogarty A. C. Water dynamics in protein hydration shells: The molecular origins of the dynamical perturbation / A. C. Fogarty, D. Laage // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2014. – T. 118. – №. 28. – C. 7715-7729.

68. Bizzarri A. R. Molecular dynamics of water at the protein– solvent interface / A. R. Bizzarri, S. Cannistraro // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2002. – T. 106. – №. 26. – C. 6617-6633.
69. Levy Y. Water mediation in protein folding and molecular recognition / Y. Levy, J. N. Onuchic // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2006. – T. 35. – C. 389-415.
70. Denisov V. P. Protein hydration dynamics in aqueous solution / V. P. Denisov, B. Halle // *Faraday Discussions*. – 1996. – T. 103. – C. 227-244.
71. Nakagawa H. Hydration and its hydrogen bonding state on a protein surface in the crystalline state as revealed by molecular dynamics simulation / H. Nakagawa, T. Tamada // *Frontiers in Chemistry*. – 2021. – T. 9. – C. 738077.
72. Rodriguez-Almazan C. Structural basis of human triosephosphate isomerase deficiency: mutation E104D is related to alterations of a conserved water network at the dimer interface / C. Rodriguez-Almazan, R. Arreola, D. Rodriguez-Larrea, B. Aguirre-López, M. T. de Gómez-Puyou, R. Perez-Montfort, A. Torres-Larios // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – T. 283. – №. 34. – C. 23254-23263.
73. Jaenicke R. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditons / R. Jaenicke // *European Journal of Biochemistry*. – 1991. – T. 202. – №. 3. – C. 715-728.
74. Chang L. L. Mechanisms of protein stabilization in the solid state / L. L. Chang, M. J. Pikal // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 2009. – T. 98. – №. 9. – C. 2886-2908.
75. Lin T. Y. Why do some organisms use a urea-methylamine mixture as osmolyte? Thermodynamic compensation of urea and trimethylamine N-oxide interactions with protein / T. Y. Lin, S. N. Timasheff // *Biochemistry*. – 1994. – T. 33. – №. 42. – C. 12695-12701.
76. Sarkar S. Ammonium based stabilizers effectively counteract urea-induced denaturation in a small protein: insights from molecular dynamics simulations / S. Sarkar, S. Ghosh, R. Chakrabarti // *RSC advances*. – 2017. – T. 7. – №. 83. – C. 52888-52906.
77. Canepa J. Characterizing osmolyte chemical class hierarchies and functional group requirements for thermal stabilization of proteins / J. Canepa, J. Torgerson, D. K. Kim, E. Lindahl, R. Takahashi, K. Whitelock, S. P. Wilkinson // *Biophysical Chemistry*. – 2020. – T. 264. – C. 106410.
78. Li W. F. Structural features of thermozymes / W. F. Li, X. X. Zhou, P. Lu // *Biotechnology advances*. – 2005. – T. 23. – №. 4. – C. 271-281.
79. Beg I. Comparison of the thermal stabilization of proteins by oligosaccharides and monosaccharide mixtures: Measurement and analysis in the context of excluded volume theory / I. Beg, A. P. Minton, A. Islam, M. I. Hassan, F. Ahmad // *Biophysical Chemistry*. – 2018. – T. 237. – C. 31-37.

80. Ohtake S., Kita Y., Arakawa T. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state / S. Ohtake, Y. Kita, T. Arakawa // *Advanced drug delivery reviews*. – 2011. – T. 63. – №. 13. – C. 1053-1073.
81. Monhemi H. How a protein can remain stable in a solvent with high content of urea: insights from molecular dynamics simulation of *Candida antarctica* lipase B in urea: choline chloride deep eutectic solvent / H. Monhemi, M. R. Housaindokht, A. A. Moosavi-Movahedi, M. R. Bozorgmehr // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2014. – T. 16. – №. 28. – C. 14882-14893.
82. Liao Y. T. Trimethylamine N-oxide stabilizes proteins via a distinct mechanism compared with betaine and glycine / Y. T. Liao, A. C. Manson, M. R. DeLyser, W. G. Noid, P. S. Cremer // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – T. 114. – №. 10. – C. 2479-2484.
83. Mukherjee M. Bottom-up view of the mechanism of action of protein-stabilizing osmolytes / M. Mukherjee, J. Mondal // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2020. – T. 124. – №. 50. – C. 11316-11323.
84. Khan S. Osmolytes: Wonder molecules to combat protein misfolding against stress conditions / S. Khan, S. Siraj, M. Shahid, M. M. Haque, A. Islam // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2023. – T. 234. – C. 123662.
85. Xie G. Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: preferential hydration is greater for the denatured than for the native protein / G. Xie, S. N. Timasheff // *Protein Science*. – 1997. – T. 6. – №. 1. – C. 211-221.
86. de Oliveira I. P. The shift in urea orientation at protein surfaces at low pH is compatible with a direct mechanism of protein denaturation / I. P. de Oliveira, L. Martínez // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2020. – T. 22. – №. 1. – C. 354-367.
87. Gajardo-Parra N. F. Osmolyte effect on enzymatic stability and reaction equilibrium of formate dehydrogenase / N. F. Gajardo-Parra, H. Akrofi-Mantey, M. Ascani, E. Cea-Klapp, J. M. Garrido, G. Sadowski, C. Held // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2022. – T. 24. – №. 45. – C. 27930-27939.
88. Barletta G. P. Protein fluctuations and cavity changes relationship / G. P. Barletta, S. Fernandez-Alberti // *Journal of Chemical Theory and Computation*. – 2018. – T. 14. – №. 2. – C. 998-1008.
89. Paramo T. Efficient characterization of protein cavities within molecular simulation trajectories: trj_cavity / T. Paramo, A. East, D. Garzón, M. B. Ulmschneider, P. J. Bond // *Journal of chemical theory and computation*. – 2014. – T. 10. – №. 5. – C. 2151-2164.

90. Miao Y. Active-site hydration and water diffusion in cytochrome P450cam: a highly dynamic process / Y. Miao, J. Baudry // *Biophysical Journal*. – 2011. – T. 101. – №. 6. – C. 1493-1503.
91. Novales N. A. Comparing the effects of organic cosolvents on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity / N. A. Novales, J. P. Schwans // *Analytical Biochemistry*. – 2022. – T. 654. – C. 114796.
92. Vagenende V. Quantitative characterization of local protein solvation to predict solvent effects on protein structure / V. Vagenende, B. L. Trout // *Biophysical journal*. – 2012. – T. 103. – №. 6. – C. 1354-1362.
93. Masson P. Effects of viscosity and osmotic stress on the reaction of human butyrylcholinesterase with cresyl saligenin phosphate, a toxicant related to aerotoxic syndrome: Kinetic and molecular dynamics studies / P. Masson, S. Lushchekina, L. M. Schopfer, O. Lockridge // *Biochemical Journal*. – 2013. – T. 454. – №. 3. – C. 387-399.
94. Wang M. The Role of Glycerol in Preserving Proteins Needs to Be Reconsidered / M. Wang, Y. Sheng, H. Cui, A. Li, X. Li, H. Huang // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. – 2022. – T. 10. – №. 46. – C. 15175-15185.
95. Seo U. An Algorithm for Computing Side Chain Conformational Variations of a Protein Tunnel/Channel / U. Seo, K. J. Kim, B. S. Kang // *Molecules*. – 2018. – T. 23. – №. 10. – C. 2459.
96. Kokkinidis M. Protein flexibility and enzymatic catalysis / M. Kokkinidis, N. M. Glykos, V. E. Fadoulglou // *Advances in protein chemistry and structural biology*. – 2012. – T. 87. – C. 181-218.
97. Meiering E. M. Effect of active site residues in barnase on activity and stability / E. M. Meiering, L. Serrano, A. R. Fersht // *Journal of molecular biology*. – 1992. – T. 225. – №. 3. – C. 585-589.
98. Némethy G. [12] Orientation of amino acid side chains: Intraprotein and solvent interactions / G. Némethy // *Methods in Enzymology*. – Academic Press, 1986. – T. 127. – C. 183-196.
99. Lovell S. C. The penultimate rotamer library / S. C. Lovell, J. M. Word, J. S. Richardson, D. C. Richardson // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2000. – T. 40. – №. 3. – C. 389-408.
100. Haddad Y. Rotamer dynamics: analysis of rotamers in molecular dynamics simulations of proteins / Y. Haddad, V. Adam, Z. Heger // *Biophysical journal*. – 2019. – T. 116. – №. 11. – C. 2062-2072.

101. Laskowski R. A. The structural basis of allosteric regulation in proteins / R. A. Laskowski, F. Gerick, J. M. Thornton // *FEBS letters*. – 2009. – Т. 583. – №. 11. – С. 1692-1698.
102. Sepasi Tehrani H. Effect of compatible and noncompatible osmolytes on the enzymatic activity and thermal stability of bovine liver catalase / H. Sepasi Tehrani, A. A. Moosavi-Movahedi, H. Ghourchian, F. Ahmad, A. Kiany, M. S. Atri, A. A. Saboury // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2013. – Т. 31. – №. 12. – С. 1440-1454.
103. Burg M. B. Urea and methylamines have similar effects on aldose reductase activity / M. B. Burg, E. M. Peters // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. – 1997. – Т. 273. – №. 6. – С. F1048-F1053.
104. Olsen S. N. Effects of osmolytes on hexokinase kinetics combined with macromolecular crowding: test of the osmolyte compatibility hypothesis towards crowded systems / S. N. Olsen, H. Ramløv, P. Westh // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. – 2007. – Т. 148. – №. 2. – С. 339-345.
105. Saburova E. A. Functional properties of lactate dehydrogenase from *Dunaliella salina* and its role in glycerol synthesis / E. A. Saburova, N. V. Avseenko, N. B. Simonova, L. I. Elfimova, N. A. Pronina, V. E. Semenenko // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2000. – Т. 47. – С. 761-771.
106. Chopra S. A balancing act between net uptake of water during dihydrofolate binding and net release of water upon NADPH binding in R67 dihydrofolate reductase / S. Chopra, R. M. Dooling, C. G. Horner, E. E. Howell // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Т. 283. – №. 8. – С. 4690-4698.
107. Hollingsworth S. A. Molecular dynamics simulation for all / S. A. Hollingsworth, R. O. Dror // *Neuron*. – 2018. – Т. 99. – №. 6. – С. 1129-1143.
108. Allen, M. P. Introduction to molecular dynamics simulation / M. P. Allen // *Computational soft matter: from synthetic polymers to proteins*. – 2004. – V. 23. – P. 1–28.
109. Adcock, S. A. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins / S. A. Adcock, J. A. McCammon // *Chemical reviews*. – 2006. – V. 106. – №. 5. – P. 1589–1615
110. Schlick T. Biomolecular modeling and simulation: a field coming of age / T. Schlick, R. Collepardo-Guevara, L. A. Halvorsen, S. Jung, X. Xiao // *Quarterly reviews of biophysics*. – 2011. – Т. 44. – №. 2. – С. 191-228.
111. Иванов В. А. Методы компьютерного моделирования для исследования полимеров и биополимеров / В. А. Иванов, А. Р. Хохлов, А. Л. Рабинович // Москва. – 2009.

112. Wang J. Development and testing of a general amber force field / J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case // *Journal of computational chemistry*. – 2004. – T. 25. – №. 9. – C. 1157-1174.
113. Vanommeslaeghe K. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields / K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, A. D. Mackerell Jr // *Journal of computational chemistry*. – 2010. – T. 31. – №. 4. – C. 671-690.
114. Jorgensen W. L. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids / W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, J. Tirado-Rives // *Journal of the American Chemical Society*. – 1996. – T. 118. – №. 45. – C. 11225-11236.
115. Oostenbrink C. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6 / C. Oostenbrink, A. Villa, A. E. Mark, W. F. Van Gunsteren // *Journal of computational chemistry*. – 2004. – T. 25. – №. 13. – C. 1656-1676.
116. Budarapu P. R. Multiscale modeling of material failure: Theory and computational methods / P. R. Budarapu, X. Zhuang, T. Rabczuk, S. P. Bordas // *Advances in applied mechanics*. – 2019. – T. 52. – C. 1-103.
117. Maiorov V. N. Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins / V. N. Maiorov, G. M. Crippen // *Journal of molecular biology*. – 1994. – T. 235. – №. 2. – C. 625-634.
118. Cooper A. Thermodynamic fluctuations in protein molecules / A. Cooper // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1976. – T. 73. – №. 8. – C. 2740-2741.
119. Lobanov M. Y. Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness / M. Y. Lobanov, N. S. Bogatyreva, O. V. Galzitskaya // *Molecular Biology*. – 2008. – T. 42. – №. 4. – C. 623-628.
120. Connolly M. L. Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids / M. L. Connolly // *Science*. – 1983. – T. 221. – №. 4612. – C. 709-713.
121. Newman K. E. Kirkwood–Buff solution theory: derivation and applications / K. E. Newman // *Chemical Society Reviews*. – 1994. – T. 23. – №. 1. – C. 31-40.
122. Gee M. B. Kirkwood–Buff theory of molecular and protein association, aggregation, and cellular crowding / M. B. Gee, P. E. Smith // *The journal of chemical physics*. – 2009. – T. 131. – №. 16.

123. Pierce V. Recent applications of Kirkwood–Buff theory to biological systems / V. Pierce, M. Kang, M. Aburi, S. Weerasinghe, P. E. Smith // Cell biochemistry and biophysics. – 2008. – T. 50. – C. 1-22.
124. Kang M. Preferential interaction parameters in biological systems by Kirkwood–Buff theory and computer simulation / M. Kang, P. E. Smith // Fluid Phase Equilibria. – 2007. – T. 256. – №. 1-2. – C. 14-19.
125. Martinez L. Molecular interpretation of preferential interactions in protein solvation: a solvent-shell perspective by means of minimum-distance distribution functions / L. Martinez, S. Shimizu // Journal of chemical theory and computation. – 2017. – T. 13. – №. 12. – C. 6358-6372.
126. Hruska E. AutoSolvate: A toolkit for automating quantum chemistry design and discovery of solvated molecules / E. Hruska, A. Gale, X. Huang, F. Liu // The Journal of Chemical Physics. – 2022. – T. 156. – №. 12.
127. Hastings J. W. Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems / J. W. Hastings // Journal of molecular evolution. – 1983. – T. 19. – C. 309-321.
128. Haddock S. H. Insights Into the Biodiversity, Behavior, and Bioluminescence of Deep-Sea Organisms: Using Molecular and Maritime Technology / S. H. Haddock, L. M. Christianson, W. R. Francis, S. Martini, C. W. Dunn, P. R. Pugh, E. V. Thuesen // Oceanography. – 2017. – T. 30. – №. 4. – C. 38-47.
129. Fisher A. J. Three-dimensional structure of bacterial luciferase from *Vibrio harveyi* at 2.4. Å resolution / A. J. Fisher, F. M. Raushel, T. O. Baldwin, I. Rayment // Biochemistry. – 1995. – T. 34. – №. 20. – C. 6581-6586.
130. Li Y. Bacterial bioluminescence assay for bioanalysis and bioimaging / Y. Li, X. He, W. Zhu, H. Li, W. Wang // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2022. – C. 1-9.
131. Tinikul R. Structure, mechanism, and mutation of bacterial luciferase / R. Tinikul, P. Chaiyen // Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology-Volume 3. – Springer, Cham, 2014. – P. 47–74.
132. Baldwin T. O. Chemistry and Biochemistry of flavoenzymes / T. O. Baldwin, M. M. Ziegler, F. Müller // Volume III (F. Muller, Ed.). – 1992. – T. 467.
133. Fisher A. J. The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions / A. J. Fisher, T. B. Thompson, J. B. Thoden, T. O. Baldwin, I. Rayment // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – T. 271. – №. 36. – C. 21956-21968.

134. Campbell Z. T. et al. Crystal structure of the bacterial luciferase/flavin complex provides insight into the function of the β subunit // *Biochemistry*. – 2009. – T. 48. – №. 26. – C. 6085-6094.
135. Cline T. W. Mutationally altered bacterial luciferase. Implications for subunit functions / T. W. Cline, J. W. Hastings // *Biochemistry*. – 1972. – T. 11. – №. 18. – C. 3359-3370.
136. Madvar A. R. Implication of a critical residue (Glu175) in structure and function of bacterial luciferase / A. R. Madvar, S. Hosseinkhani, K. Khajeh, B. Ranjbar, A. Asoodeh // *FEBS letters*. – 2005. – T. 579. – №. 21. – C. 4701-4706.
137. Xin X. Functional consequences of site-directed mutation of conserved histidyl residues of the bacterial luciferase. alpha. subunit / X. Xin, L. Xi, S. C. Tu // *Biochemistry*. – 1991. – T. 30. – №. 47. – C. 11255-11262.
138. Campbell Z. T. Analysis of the bacterial luciferase mobile loop by replica-exchange molecular dynamics / Z. T. Campbell, T. O. Baldwin, O. Miyashita // *Biophysical journal*. – 2010. – T. 99. – №. 12. – C. 4012-4019.
139. Berman H. M. The protein data bank / H. M. Berman, T. Battistuz, T. N. Bhat, W. F. Bluhm, P. E. Bourne, K. Burkhardt, C. Zardecki // *Nucleic acids research*. – 2000. – T. 28. – №. 1. – C. 235-242.
140. Webb B. Comparative protein structure modeling using MODELLER / B. Webb, A. Sali // *Current protocols in bioinformatics*. – 2016. – T. 54. – №. 1. – C. 5.6. 1-5.6. 37.
141. Pettersen E. F. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis / E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin // *Journal of computational chemistry*. – 2004. – T. 25. – №. 13. – C. 1605-1612.
142. Waterhouse A. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes / A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, T. Schwede // *Nucleic acids research*. – 2018. – T. 46. – №. W1. – C. W296-W303
143. Illarionov B. A. Nucleotide sequence of genes for alpha-and beta-subunits of luciferase from *Photobacterium leiognathi* / B. A. Illarionov, M. V. Protopopova, V. A. Karginov, N. P. Mertvetsov, I. I. Gitel'zon // *Bioorganicheskaya Khimiya*. – 1988. – T. 14. – №. 3. – C. 412-415.
144. UniProt: the universal protein knowledgebase // *Nucleic acids research*. – 2017. – T. 45. – №. D1. – C. D158-D169.
145. Van Der Spoel D. GROMACS: fast, flexible, and free / D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. Berendsen // *Journal of computational chemistry*. – 2005. – T. 26. – №. 16. – C. 1701-1718.
146. Kim S. CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules / S. Kim, J. Lee, S. Jo, C. L. Brooks III, H. S. Lee, W. Im // . – 2017.

147. OUELLETTE R. J. a J. David RAWN / R. J. Ouellette, J. D. Rawn // *Amino Acids, Peptides, and Proteins, Organic Chemistry (Second Edition) Structure, Mechanism, Synthesis.* – 2018. – С. 929-971
148. Batcho P. F. Optimized particle-mesh Ewald/multiple-time step integration for molecular dynamics simulations / P. F. Batcho, D. A. Case, T. Schlick // *The Journal of Chemical Physics.* – 2001. – Т. 115. – №. 9. – С. 4003-4018.
149. Hünenberger P. H. Thermostat algorithms for molecular dynamics simulations / P. H. Hünenberger // *Advanced computer simulation.* – 2005. – С. 105-149.
150. Melchionna S. Hoover NPT dynamics for systems varying in shape and size / S. Melchionna, G. Ciccotti, B. Lee Holian // *Molecular Physics.* – 1993. – Т. 78. – №. 3. – С. 533-544.
151. Tian W. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins / W. Tian, C. Chen, X. Lei, J. Zhao, J. Liang // *Nucleic acids research.* – 2018. – Т. 46. – №. W1. – С. W363-W367.
152. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics / W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten // *Journal of molecular graphics.* – 1996. – Т. 14. – №. 1. – С. 33-38.
153. Финкельштейн А. В. Физика белка / А. В. Финкельштейн, О. Б. Птицын // М.: Книжный дом «Университет». – 2002. – Т. 41.
154. Sukovatyi L. A. The Effect of Osmolytes on the Bioluminescent Reaction of Bacteria: Structural and Dynamic Properties / L. A. Sukovatyi, A. E. Lisitsa, V. A. Kratasyuk, E. V. Nemtseva // *Biophysics.* – 2020. – Т. 65. – №. 6. – С. 966-971
155. Lisitsa A. E. Viscous media slow down the decay of the key intermediate in bacterial bioluminescent reaction / A. E. Lisitsa, L. A. Sukovatyi, V. A. Kratasyuk, E. V. Nemtseva // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* – Pleiades Publishing, 2020. – Т. 492. – №. 1. – С. 162-165.
156. Jumper J. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, D. Hassabis // *Nature.* – 2021. – Т. 596. – №. 7873. – С. 583-589.
157. Nagibina G. S. Intrinsic disorder-based design of stable globular proteins / G. S. Nagibina, K. A. Glukhova, V. N. Uversky, T. N. Melnik, B. S. Melnik // *Biomolecules.* – 2019. – Т. 10. – №. 1. – С. 64.
158. Klose D. P., Wallace B. A., Janes R. W. 2Struc: the secondary structure server / D. P. Klose, B. A. Wallace, R. W. Janes // *Bioinformatics.* – 2010. – Т. 26. – №. 20. – С. 2624-2625.

159. Xue B. PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids / B. Xue, R. L. Dunbrack, R. W. Williams, A. K. Dunker, V. N. Uversky // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. – 2010. – T. 1804. – №. 4. – C. 996-1010.
160. Nemtseva E. V. Bacterial luciferases from *Vibrio harveyi* and *Photobacterium leiognathi* demonstrate different conformational stability as detected by time-resolved fluorescence spectroscopy / E. V. Nemtseva, D. V. Gulnov, M. A. Gerasimova, L. A. Sukovaty, L. P. Burakova, N. E. Karuzina, V. A. Kratasyuk // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – T. 22. – №. 19. – C. 10449.
161. Noland B. W. Folding, stability, and physical properties of the α subunit of bacterial luciferase / B. W. Noland, L. J. Dangott, T. O. Baldwin // *Biochemistry*. – 1999. – T. 38. – №. 49. – C. 16136-16145.
162. Bansia H. Small glycols discover cryptic pockets on proteins for fragment-based approaches / H. Bansia, P. Mahanta, N. H. Yennawar, S. Ramakumar // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2021. – T. 61. – №. 3. – C. 1322-1333.
163. Virtanen J. J. et al. Modeling the hydration layer around proteins: HyPred / J. J. Virtanen, L. Makowski, T. R. Sosnick, K. F. Freed // *Biophysical journal*. – 2010. – T. 99. – №. 5. – C. 1611-1619.
164. Oliveira I. P., Martínez L. Molecular basis for competitive solvation of the Burkholderia cepacia lipase by sorbitol and urea / I. P. Oliveira, L. Martínez // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2016. – T. 18. – №. 31. – C. 21797-21808.
165. Miotto M. et al. Osmolyte-Induced Protein Stability Changes Explained by Graph Theory / M. Miotto, N. Warner, G. Ruocco, G. G. Tartaglia, O. A. Scherman and E. Milanetti // *arXiv preprint arXiv:2305.05038*. – 2023.
166. Deeva A. A. et al. Structure-function relationships in temperature effects on bacterial luciferases: Nothing is perfect / A. A. Deeva, L. A. Sukovaty, A. E. Lisitsa, T. N. Melnik, V. A. Kratasyuk, and E. V. Nemtseva // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – T. 23. – №. 15. – C. 8119.
167. Gulnov D. V. et al. Effect of viscous media on the photophysical characteristics of flavin mononucleotide / D. V. Gulnov, M. A. Gerasimova, L. A. Sukovaty and E. V. Nemtseva // *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. – 2022. – T. 86. – №. 10. – C. 1196-1202.
168. Sutormin O. S. et al. Coupling of NAD(P)H:FMN-oxidoreductase and luciferase from luminous bacteria in a viscous medium: Finding the weakest link in the chain / O. S. Sutormin, E. V. Nemtseva, D. V. Gulnov, L. A. Sukovaty, Y. S. Tyrtysnaya, A. E. Lisitsa, V. A. Kratasyuk // *Photochemistry and Photobiology*. – 2023.

169. Sohrabi-Mahboub M., Jahangiri S., Farrokhpour H. Molecular dynamics simulation of the hydration of adenosine phosphates / M. Sohrabi-Mahboub, S. Jahangiri, H. Farrokhpour // Journal of Molecular Liquids. – 2019. – T. 283. – C. 359-365.
170. Nishimoto K., Watanabe Y., Yagi K. Hydrogen bonding of flavoprotein. I. Effect of hydrogen bonding on electronic spectra of flavoprotein / K. Nishimoto, Y. Watanabe, K. Yagi // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology. – 1978. – T. 526. – №. 1. – C. 34-41.
171. Heikal A. et al. Structure of the bacterial type II NADH dehydrogenase: a monotopic membrane protein with an essential role in energy generation / A. Heikal, Y. Nakatani, E. Dunn, M. R. Weimar, C.e L. Day, E. N. Baker, J. S. Lott, L. A. Sazanov, G.M. Cook // Molecular microbiology. – 2014. – T. 91. – №. 5. – C. 950-964.
172. Malekshah O. M. et al. Enzyme/prodrug systems for cancer gene therapy / O. M. Malekshah, X. Chen, A. Nomani, S, Sarkar and Arash Hatefi // Current pharmacology reports. – 2016. – T. 2. – C. 299-308.
173. Swe P. M. et al. Targeted mutagenesis of the *Vibrio fischeri* flavin reductase FRase I to improve activation of the anticancer prodrug CB1954 / P.M. Swe, J.N. Copp, L.K. Green, C.P. Guise, A.M. Mowday, J.B. Smaill, A.V. Patterson and D.F. Ackerley // Biochemical pharmacology. – 2012. – T. 84. – №. 6. – C. 775-783.