

На правах рукописи

Изотова Екатерина Дмитриевна

**РОЛЬ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
СИЛИКАТЕИНА-А В ПРОЦЕССЕ БИОСИЛИФИКАЦИИ ПО ДАННЫМ
КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

1.5.2 - биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2021

Работа выполнена на базе кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Института фундаментальной медицины и биологии (ИФМиБ), Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет" (ФГАОУ ВО КФУ)

Научный руководитель: **Акберова Наталья Ивановна** кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии ИФМиБ, ФГАОУ ВО КФУ, г. Казань

Официальные оппоненты: **Холявка Марина Геннадьевна** доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», г. Воронеж.
Григорьев Федор Васильевич, кандидат химических наук, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории Вычислительных систем и прикладных технологий программирования, Научно-исследовательского вычислительного центра, МГУ имени М.В. Ломоносова.

Ведущая организация: **Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук.**

Защита состоится **«16» декабря 2021 в 14.00** часов на заседании диссертационного совета 24.1.225.02 при ФГБУН ФИЦ КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, д. 2/31, тел/факс (843)2927347, e-mail: dissovet@kibb.knc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Казанского научного центра РАН и на официальном сайте ФИЦ КазНЦ РАН <http://www.kibb.knc.ru>. Автореферат разослан «___» 2021г

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского 2/31 КИББ-обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАНб ученому секретарю диссертационного совета (e-mail: dissovet@kibb.knc.ru)

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Анастасия Анатольевна Пономарева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Кремнийорганические соединения и их производные продолжают оставаться важными элементами во многих высокотехнологичных продуктах в области биомедицины и биотехнологии (Rücker, 2015; Ramesh and Reddy, 2018; Jafari *et al.*, 2019), электроники и высоковольтной изоляции (Mohammadian *et al.*, 2018). Синтез таких соединений сложен и сопряжен с применением высоких температур 400–2300°C (Polini *et al.*, 2012), давления 20 - 40 ГПа (Petitgirard *et al.*, 2019), экстремальных значений pH (Yang *et al.*, 2018), а так же экологически небезопасного хлорсилана и его производных (Rücker *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2021).

Среди многоклеточных животных губки (тип Porifera) являются единственными организмами, способными образовывать скелетные кварцевоподобные элементы (спикулы) из растворенных кремниевых кислот в процессе своей естественной жизнедеятельности (Belton *et al.*, 2010; Schröder *et al.*, 2016), основную роль в котором отводят изоферменту силикатеину- α , являющемуся членом семейства катепсиновых протеиназ (Craik *et al.*, 1987; Povarova *et al.*, 2018). Спикулогенез протекает при температуре окружающей среды, нейтральном pH и низких концентрациях растворенных субстратов (Schröder *et al.*, 2016).

Помимо конденсации кремниевых кислот и кремнийорганических соединений (Sparkes *et al.*, 2020) силикатеин- α способен проводить реакции поликонденсации с участием оксидов металлов, карбонатов (TiO_2 , $\gamma\text{-Ga}_2\text{O}_3$, ZrO_2 , CaTiO_3 , CaCO_3) и активировать реакции образования наночастиц Au или Ag (Kisailus *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2018).

Механизм ферментативного катализа силикатеина- α до сих пор остается дискуссионным в области молекулярной биофизики белков (Craik *et al.*, 1987; Povarova *et al.*, 2018; Görlich *et al.* 2020). В основе предложенных моделей катализа силикатеина- α лежат механизмы действия сериновых и цистеиновых протеаз (Polini *et al.*, 2012; Veremeichik *et al.*, 2011). Несмотря на то, что аминокислотная последовательность силикатеина- α на 65% схожа с катепсином L человека (Fairhead *et al.*, 2008), превращаемые этими ферментами субстраты сильно отличаются (Zhou *et al.*, 1999; Dakhili *et al.*, 2017). Результаты экспериментальных исследований по изучению механизма катализа силикатеина- α не могут быть напрямую применены для определения механизма биосилификации. Во-первых, в работах с модельным субстратом чаще всего выступает тетраэтилортосиликат (ТЭОС) (Zhou *et al.*, 1999; Fairhead *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2014; Sparkes *et al.*, 2020 и др.), в то время как природными субстратами для силикатеина- α являются растворенные кремниевые кислоты с различной длиной цепочки (Dakhili *et al.*, 2017). Во-вторых, знания об изомерном разнообразии кремниевых кислот, являющихся природными субстратами силикатеина- α , носят фрагментарный характер (Sjöberg *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 2006; Vorba *et al.*, 2017). В-третьих, использование в экспериментах органических растворителей (гексан, этанол и др.) может привести к получению иных результатов (Halasz *et al.*, 2011; Warring *et al.*, 2016), поскольку ферментативный катализ осуществляется в воде.

В связи с этим силикатеин- α является перспективным ферментом для современного наукоемкого производства и биотехнологии, а тот факт, что водные организмы перерабатывают около 6-7 гигатонн/год биокремнезема для строительства кремниевых экзоскелетов, является многообещающей недорогой альтернативой их промышленному синтезу (Schröder *et al.*, 2012).

Основными вопросами молекулярной биофизики силикатеина- α являются оценка субстратного разнообразия кремниевых кислот в водном растворе, выявление механизма взаимодействия силикатеина- α с природными субстратами, а так же получение информации о начальной конфигурации активного центра силикатеина- α и областей взаимодействия природных субстратов с поверхностью силикатеина- α . Решение этих вопросов приблизит к разработке технологически направленного биотехнологического процесса получения кремниевых структур.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования является поиск функционально значимых областей и конформаций активного центра силикатеина- α для инициации олигомеризации кремниевых кислот.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Оценить конфигурационные особенности каталитической триады силикатеина- α при инициации конденсации кремниевых кислот;
- 2) Получить и охарактеризовать олигомерное разнообразие являющихся природными субстратами для силикатеина- α кремниевых кислот в водном растворе методом молекулярной динамики с использованием реакционного силового поля Feuston и Garofalini;
- 3) Охарактеризовать ключевые геометрические параметры природных лигандов силикатеина- α : $\angle \text{Si-O-Si}$ и $\angle \text{O-Si-O}$, длины связи Si-O и O-H и среднее координационное число атома Si;
- 4) Выявить области связывания избранных олигомеров кремниевых кислот со структурой силикатеина- α .

Научная новизна работы. В данной работе показано, что реакционное силовое поле Feuston and Garofalini (FG) адекватно воспроизводит ключевые геометрические параметры, при этом на долю IV координационного атома Si приходится $\sim 98\%$.

Впервые применен метод молекулярной динамики для получения олигомерного разнообразия кремниевых кислот в водном растворе. Олигомерное разнообразие для структур с количеством атомов кремния $\text{Si}_n=3-5$ полностью согласуется с данными экспериментальных методов, для олигомеров с большим числом атомов Si обнаружены ранее неидентифицированные олигомеры: для $\text{Si}_n=6$ - 23, для $\text{Si}_n=7$ - 56, среди $\text{Si}_n=8$ - 108 структур. В моделируемой системе доминируют линейные и разветвленные формы олигомеров, что также согласуется с экспериментальными данными. Впервые произведена оценка времени полужизни силанольных и силоксановых связей олигомеров кремниевых кислот в рамках использования реакционного силового поля FG.

Впервые методами квантовой химии показано, что степень протонирования азотов и поворот имидазольного кольца His влияет на характер связывания каталитической триады силикатеина- α и $\text{Si}(\text{OH})_4$. Определены конфигурации каталитической триады силикатеина- α с минимальной энергией связывания с субстратом $-32,82$ ккал/моль и $-26,78$ ккал/моль, которые содержат полностью депротонированы атомы азота при повороте плоскости имидазольного кольца His относительно оси связи $\text{C}\alpha\text{—C}\beta$ на угол 0° и 180° , соответственно. Среди частично депротонированных конфигураций каталитической триады силикатеина- α определены состояния, характеризующиеся наличием двух минимумов энергии связывания с субстратом со значениями $-26,69$ ккал/моль и $-16,53$ ккал/моль. Частично депротонированные

конфигурации с минимальными значениями энергиями связывания характеризуются протонированием πN и не зависят от поворота плоскости имидазольного кольца His.

Методом молекулярного докинга впервые продемонстрировано, что кремниевые кислоты с длиной цепочки $Si_n = 1-6$ связываются со структурой силикатеина- α и пре-силикатеина- α в трех областях: Asp6, Ser25, Thr94 и Asp68, Thr329 и Ser131, соответственно. Для большинства лигандов $Si_n = 1-4$ максимальная аффинность характерна для региона вблизи Ser25 (-16,1 ккал/моль) и Ser131 (-10,96 ккал/моль). Лиганды большего размера $Si_n = 5-6$ начинают эффективно связываться с областью вблизи Asp6 (силикатеин- α) и с областью Thr329 (пре-силикатеин- α). Наибольшей энергией связывания обладают комплексы силикатеина- α с линейными или разветвленными кремниевыми кислотами, в то время как циклические изомеры кремниевых кислот $Si_n = 3-5$ имеют максимальную аффинность к району Asp6, для силикатеина- α . Для пре-силикатеин- α области вблизи активного центра (АЦ) для малых олигомеров разделены на 2 региона, которые с увеличением размеров докмуемых лигандов сливаются в одну область с общими аминокислотными остатками (АО): Glu132, Ser131 (АЦ), Asp134, Lys130 и Ser298.

Научно-практическая значимость работы. Предложенный в работе подход для оценки олигомерного разнообразия кремниевых кислот в растворе позволит разработать математическую модель процесса биосилификации и модель на основе машинного обучения для анализа и идентификации отдельных олигомерных состояний на основе данных спектроскопии ЯМР, лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния, ИК-Фурье спектроскопии, малоуглового рассеяния рентгеновского излучения и других экспериментальных методов.

Предложенный в работе подход для оценки олигомерного разнообразия кремниевых кислот может быть расширен для поиска равновесных структур допированных атомами Na, Al, C, Zn, Ca и др., что позволит использовать его при разработке и получении новых материалов на основе кремния.

Полученные данные о влиянии степени протонирования атомов азота и поворота имидазольного кольца His могут внести вклад в понимание механизмов катализа и расширение научных представлений об основных закономерностях ферментативного катализа силикатеина- α . Выявленные области связывания природных субстратов (кремниевых кислот) с силикатеином- α позволят предположить механизмы регуляции ферментативной активности и определить области адгезии силикатов, поскольку изучаемый фермент обладает как ферментативной, так и структурообразующей активностями.

Личный вклад диссертанта в исследования. Приведенные в работе данные получены при личном участии соискателя на всех этапах работы, включая составление плана исследования, проведение экспериментов, обработку полученных данных и оформление публикаций. Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора или в соавторстве с Тарасовым Д.С. (совместная реализация силового поля FG на графических процессорах); Акберовой Н.И. и Алишевой Д.И. (совместное построение структуры и проведение молекулярной динамики (МД) силикатеина- α); Акберовой Н.И. (предсказание структур силикатеина- α и пре-силикатеина- α); Чаплановым В.В. (квантово-химические расчеты избранных олигомеров); Акберовой Н.И. и Рудаковой М.А. (обсуждение полученных результатов).

Положения, выносимые на защиту.

- 1) Реакционное силовое поле Feuston and Garofalini может быть использовано для широкомасштабного моделирования реакций олигомеризации кремниевых кислот в водном растворе.
- 2) Полученный методом молекулярной динамики частотный спектр и разнообразие кремниевых кислот сопоставимы с данными эксперимента.
- 3) Полностью депротонированная форма имидазольного кольца His является потенциально значимой для активации молекулы Si(OH)₄, при этом конфигурации, в которых протонирован только атом πN, также могут иметь существенное значение при каталитической конденсации кремниевых кислот силикатеином-α независимо от поворота имидазольного кольца.
- 4) Кремниевые кислоты с длиной цепочки Si_n = 1-6 связываются со структурой силикатеина-α и пре-силикатеина-α в трех областях: Asp6, Ser25, Thr94 и Asp68, Thr329 и Ser131, соответственно. Для лигандов Si_n = 1-4 максимальная аффинность для региона вблизи Ser25 (-16,1 ккал/моль) и Ser131 (-10,96 ккал/моль). Лиганды большего размера Si_n = 5-6 начинают эффективно связываться с областью вблизи Asp6 (силикатеин-α) и с областью Thr329 (пре-силикатеин-α).

Достоверность полученных данных. Достоверность полученных данных основана на большом объеме результатов вычислительных экспериментов с использованием методических подходов и статистической обработки полученных результатов. Численные эксперименты проведены в нескольких повторах (от 3 до 10).

Квантово-химическое моделирование избранных олигомеров и конфигураций активного центра силикатеина-α выполнено с использованием методов теории функционала плотности (DFT) с применением расширенного обменного функционала X3LYP и B3LYP в базисных наборах 6-31G(d)/6-311++G(2d, p), с добавлением диффузных s- и p-функций на тяжёлые атомы и 2p и 1d – на атомы водорода.

Полученный в данной работе характер олигомерного разнообразия качественно согласуется как с данными спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР ²⁹Si), так и с результатами ранее проведенных исследований методами квантовой химии.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на III Международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань –2018); на Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика» (Пушино, 2018); на VII Всероссийской конференции по структуре и энергетике молекул (Иваново, 2018); на XLII Междисциплинарной школе-конференции "Информационные технологии и системы" (Казань, 2018); на XXIII Международной Пушинской школе-конференции Молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, 2019); на XII Всероссийском съезде по фундаментальным проблемам теоретической и прикладной механики (Уфа, 2019); на XXX Всероссийской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Екатеринбург, 2020); на IX Всероссийской молодежной научной конференции «функциональные материалы: синтез, свойства, применение» (Санкт-Петербург, 2020); на X Национальной кристаллохимической конференции (Приэльбрусье, 2021); на XVI международной научная конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2021» (Севастополь, 2021).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ из которых 5 из списка ВАК, 9 тезисов и 1 свидетельство о Государственной регистрации программы для ЭВМ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 223 источника, из них 214 зарубежных. В работе представлено 2 таблицы и 42 рисунка и приложение А-В.

1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Молекулярные модели. В работе использовались молекулярные модели силикатеина- α , структура которых разрешена экспериментально методом рентгеноструктурного анализа, это: модель (pdb 6ZQ3) — силикатеина- α получена из организма *T. aurantium* (Görlich *et al.*, 2020) и модель химерного белка «4SER» катепсина L человека (pdb 2VHS), приближенная к структуре силикатеина- α и обладающая максимальной кремний полимеризующиеся активностью (Fairched *et al.*, 2009). И модель пре-силикатеина- α предсказанная методом *ab-initio* по первичной последовательности из *T. aurantium* (код NCBI: AAC23951.1). Модель 2VHS состоит из четырех гомологичных доменов, в работе использовался домен А.

Лигандами выступали кремниевые кислоты, являющиеся природными субстратами для силикатеина- α с различной длиной цепочки $Si_n=1-6$ и степенью ветвления.

1.2. Конформационные особенности силикатеина- α для начального этапа олигомеризации $Si(OH)_4$

1.2.1. Подготовка молекулярной модели структуры силикатеина- α . Подготовка молекулярной модели силикатеина- α (pdb 2VHS) проходила в программе Gromacs-3.3.1 (Leach, 2001) и включала: очистку координат от примесей, центрирование, растворение полученной структуры в кубе воды размером $77,86*67,01*63,86 \text{ \AA}$ с потенциалом Amber99 (Zwart *et al.*, 2007). Минимизация и МД проводилась в программе Gromacs, согласно протоколу (Yang *et al.*, 2007), в течение 3нс, при температуре 300К, с учетом модели растворителя PCM (Fennell and Gezelter, 2006) в двух повторах. Структура модели фермента, оценивалась по изменению следующих параметров: среднеквадратичное отклонение, поверхность доступная растворителю, а также подвижности аминокислот активного центра. Полученные данные анализировали с помощью программного пакета VMD (Humphrey *et al.* 1996). Использовался разработанный подход, который был апробирован для моделирования взаимодействия различных макромолекул с лигандами, в том числе и для изучения взаимодействия линолевой кислоты с ДНК в водном растворе (Тарасов с соавт., 2012).

1.2.2. Подготовка модели субстрата — $Si(OH)_4$. Молекула $Si(OH)_4$ была построена в программе ChemCraft (Chemcraft, 2019). Оптимизация геометрии молекулы проводилась в программе PCGAMESS/Firefly (Gordon *et al.*, 2005), методом теории функционала плотности (DFT) с функционалом X3LYP (Xu and Goddard, 2004) в валентно-расщепленном базисе 6-31G(d) с последующим пересчетом структуры в базисе 6-311++G(2d, p).

1.2.3. Подготовка 8 конформационных изомеров модели каталитической триады силикатеина- α с субстратом $Si(OH)_4$. Для квантово-химических расчетов взаимодействия $Si(OH)_4$ с АЦ силикатеина- α (pdb 2VHS) были использованы координаты АО остатков,

входящих в состав активного центра (His163, Ser25, Gln19) (АЦ), полученные на последнем шаге МД. Для имитации соединения аминокислот АЦ с полипептидной цепочкой была проведена фиксация атомов С и N, входящих в состав пептидной связи по трем пространственным координатам (X, Y, Z). Стационарные состояния каталитической триады рассчитывались методом теории функционала плотности (DFT) в функционале X3LYP (Xu and Goddard, 2004) в валентно-расщепленном базисе 6-311+G(d,p)/6-31G(d), с учетом модели растворителя РСМ. Расчеты производились в программе PC-GAMESS/Firefly (Gordon *et al.*, 2005). Для расчета частичных атомных зарядов использовалась зарядовая схема Малликена.

1.2.4. Построении поверхности потенциальной энергии переноса H^+ вдоль донорно акцепторной пары атомов. Вдоль вектора перемещения H^+ между донорно-акцепторной парой каталитическая триада-Si(OH)₄, была рассчитаны энергии системы. Расчеты проводились в программе PCGAMESS/Firefly (Gordon *et al.*, 2005) методом DFT, в функционале X3LYP (Xu and Goddard, 2004) в валентно-расщепленном базисе 6-311++G(2d,p), в газовой фазе и с использованием модели поляризованного континуума (PCM). Энергетический барьер прямой и обратной реакций перемещения H^+ рассчитан относительно начальной конформации комплекса. Молекулярные структуры комплексов были подготовлены с использованием языка программирования Python (Python, 2021) и методика успешно опробована для построения оптимальных траекторий передачи водорода в позиционно управляемом механосинтезе (Tarasov *et al.*, 2013).

1.3. Поиск областей связывания силикатеина- α с избранными олигомерами кремниевых кислот

1.3.1. Подготовка молекулярных моделей силикатеина- α . Для подготовки модели структуры силикатеина- α была проведена МД в пакете NAMD- multicore CUDA (Phillips *et al.*, 2005) с использованием силового поля CHARMM36 (Brooks *et al.*, 2009). Размер периодической ячейки составил 92 * 87 * 74 Å. Подготовка к МД в NAMD (Phillips *et al.*, 2005) включала следующие этапы: минимизацию (2 нс), нагрев (до 310К, 0,3нс) и эквilibрацию (2нс). МД составила 25нс с шагом итерации 1фс. Координаты структуры силикатеина- α последнего шага МД были оценены на наличие запрещенных углов ψ и ϕ по карте Рамачандрана (UCSF Chimera, версия 1.15), рассчитаны среднеквадратичное отклонение (RMSD) всей структуры, среднеквадратичное отклонение аминокислот активного центра (RMSF), а так же проведена оценка изменения расстояний между выбранными парами атомов. RMSD, RMSF и динамика расстояний рассчитаны в VMD, визуализированы с использованием Python, модуль matplotlib .

Подготовка модели структуры пре-силикатеина- α заключалась в построении пространственных моделей методом *ab-initio* по первичной последовательности (код AAC23951.1) пре-силикатеина- α на веб-сервиса Robetta (Kim *et al.*, 2004) и QUARK. Было пересказаны 20 моделей структуры. Оптимальная модель пре-силикатеина- α была выбрана на основании лучшей QMEAN-оценки и отсутствию запрещенных аминокислот на карте Рамачандрана.

1.3.2. Подготовка моделей природных субстратов силикатеина- α . Начальная моделируемая молекулярная система представлена равноудаленными молекулами Si(OH)₄, расположенными в периодической ячейке с размерами: 58,44 x 58,44 x 58,44Å, заполненная молекулами воды (TIP3P) с плотностью 1 г/см³.

Исследовались две системы:

система45 - модель с концентрацией ортокремниевой кислоты 0,45 г/см³, содержащая 576 мономеров Si(OH)₄ и 5220 молекул H₂O, всего атомов 20844.

система56 - модель с концентрацией ортокремниевой кислоты 0,56 г/см³, содержащая 729 мономеров Si(OH)₄ и 3026 молекул H₂O, всего атомов 15638.

Молекула Si(OH)₄ была предварительно подготовлена, согласно пункту (1.2.2).

Эквилибрация системы проводилась при температуре 300К в течение 10пс. Моделирование выполнялось при температуре 2500К, что является частью стандартной методики (Hirakawa *et al.*, 2017; Stawick *et al.*, 2020) для ускорения процесса олигомеризации кремниевых кислот. Интегрирование уравнений движения производилось с помощью алгоритма Верле с шагом 0,001 пс. Траектория движения атомов записывалась с шагом 0,1пс. Продолжительность МД составила 3 нс, что позволяет исследовать начальные этапы олигомеризации (Rao and Gelb, 2004).

В настоящей работе МД кремниевых кислот в водном растворе проводилась с использованием силового поля FG (Feuston and Garofalini, 1990), реализованного в программном пакете GRAMP (Tarasov *et al.*, 2010).

Для обработки большого массива полученной информации соискателем разработан комплекс программ на языке программирования Python (на часть кода получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2021619675).

Распределения длин ковалентных связей и валентных углов были проверены на нормальность распределения, используя критерий Шапиро-Уилка и K²-тест Д'Агостино. Для сравнения двух выборок применялся U-критерий Манна-Уитни, для множественного сравнения данных - тест Крускала-Уоллиса (Python, библиотека SciPy). При разработке задействованы библиотеки Python: json, matplotlib, scipy, numpy и statistics, NetworkX.

Избранные олигомеры (14) с количеством атомов Si_n = 1-6 были оптимизированы с использованием программного пакета ORCA (Neese, 2017), методом теории функционала плотности (DFT) с гибридным функционалом B3LYP и базисным набором 6-311G.

1.3.3. Молекулярный докинг олигомеров кремниевых кислот в силикатеин-α.

Области взаимодействия силикатеина-α с молекулами кремниевых кислот оценивались по результатам молекулярного докинга с гибким лигандом. Поиск областей связывания фермента и лиганда проходил в два этапа:

Глобальный поиск по всей поверхности: лигандом выступала молекула Si(OH)₄ - Q⁰₁ (подготовка раздел 1.2.1). На основании проведенного исследования были выделены три потенциально значимые области.

Локальный поиск по трем областям связывания был проведен с 14-тью лигандами (подготовка раздел 1.3.2), с радиусом поиска от выбранной точки — 30Å. Для каждой области методом Монте-Карло было сгенерировано 500 положений. Для визуализации областей связывания были использованы 20 состояний с наименьшей энергией связывания. Для проведения молекулярного докинга использовались сервисы BSP-SLIM (Deluca *et al.*, 2015) и ROSIE (Lee and Zhang, 2012; Lyskov *et al.*, 2013).

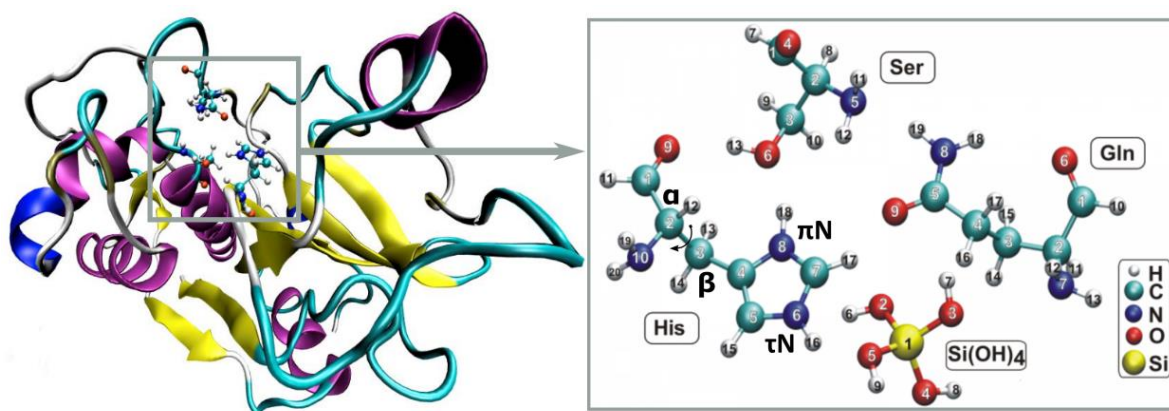
2 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Конформационные особенности силикатеина- α для начального этапа олигомеризации $\text{Si}(\text{OH})_4$

2.1.1. Квантово-химические расчеты молекулы $\text{Si}(\text{OH})_4$. В оптимизированной молекуле субстрата значение длины связи между O-H и Si-O составили $0,97\text{\AA}$ и $1,65\text{\AA}$, соответственно, значения углов разделяются на 3 типа и составляют: 106° , $116,5^\circ$ и $-113,5^\circ$, что соответствует как экспериментальными, так и расчетным данным (Fueston and Garofalini, 1990; Rimsza *et al.*, 2017).

2.1.2. Оценка подвижности силикатеина- α в ходе МД. В ходе МД RMSD мутантного силикатеина- α выходит на плато с $0,6\text{нс}$ и колебания составили не более $1,5\text{\AA}$. Наблюдается незначительное колебание АО АЦ в ходе МД. Изменение площади треугольника, образованного между АО АЦ: τN His, O — радикала Ser (O-Ser) и O — радикала Gln (O-Gln), то средняя площадь треугольника составляет $6,5\text{\AA}^2$, при длинах τN His — O-Ser в 5\AA ; O-Ser — O-Gln в $5,1\text{\AA}$ и τN His — O-Gln в $9,6\text{\AA}$.

2.1.3. Характеристика стационарных состояний каталитической триады силикатеина- α с и без $\text{Si}(\text{OH})_4$. Были сконструированы и оптимизированы молекулярные комплексы каталитическая триада - $\text{Si}(\text{OH})_4$, отличающиеся степенью протонирования азотов имидазольного кольца His и его вращения относительно связи $\text{C}\alpha\text{--C}\beta$ (рис. 1). Результаты суммированы в таблице 1. Наименьшей энергией связывания обладает полностью депротонированная форма (состояние 1) с энергией связывания в $-32,82$ ккал/моль. Для этого варианта характерны 4 водородные связи, между каталитическим центром и субстратом. В ходе оптимизации H^+ от молекулы $\text{Si}(\text{OH})_4$ переходит на πN , что в дальнейшем может привести к конденсации молекул $\text{Si}(\text{OH})_4$ по основному типу (Pereira *et al.*, 1998). Для состояний 5 и 3 наблюдается образование пяти водородных связей между каталитической триадой и субстратом, а также незначительное удлинение ковалентных связей ($\text{Si}(\text{OH})_4$ - - O - N - - N η) на $0,063\text{\AA}$ и $0,072\text{\AA}$, соответственно. Состояние 6 интересно тем, что поворот имидазольного кольца приводит к формированию пяти водородных связей между каталитической триадой и субстратом, энергия связывания для этого состояния максимальна



среди остальных и составляет $-12,32$ ккал/моль.

Рис. 1. Молекулярная модель силикатеина- α и его АЦ (His163, Ser25, Gln19) с помещенным в него субстратом $\text{Si}(\text{OH})_4$, все атомы пронумерованы.

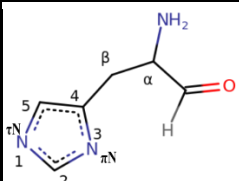
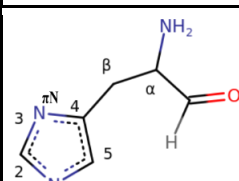
Для состояний 2 и 8 комплекса фермента с субстратом образуется цепочка водородных связей, приводящая к небольшому удлинению ковалентных связей. Так в состоянии 2

образуются водородные связи His π N-H18 - - O2 Si(OH)₄ и Si(OH)₄ H6 - -O9 Gln, длина которых 1,96Å и 1,82Å, соответственно. А в состоянии 8 водородные связи выстраиваются следующим образом: His τ N-H16 - -O3 Si(OH)₄ и Si(OH)₄ H7 - -O9 Gln, длина которых 1,65Å и 1,61Å, соответственно. Такое расположение приводит к удлинению ковалентной связи τ N-H16 на 0,05Å. И потенциально может быть исходной точкой для образования молекулы воды, удерживаемой какое-то время атомом кремния молекулы Si(OH)₄.

Состояния 5 и 6 интересны наличием коротких водородных связей между His τ N - - H-O-Si(OH)₃, равных 1,64Å и 1,81Å, соответственно. Такое расположение может быть исходной позицией переноса протона от молекулы Si(OH)₄ на τ N His.

Для состояния 3 наблюдается последовательность водородных связей, в которую вовлечена гидроксильная группа Ser: His π N - -H13 Ser и O6 Ser - -H7 Si(OH)₄, длина которых 1,75Å и 1,82Å, соответственно. По данной стартовой конфигурации комплекса можно предположить последовательный переход H⁺ гидроксила Ser на π N His, что в свою очередь может привести к переносу H⁺ с Si(OH)₄ на Ser. В результате чего кислород может совершить нуклеофильную атаку на атом кремния другой молекулы Si(OH)₄.

Таблица 1. Сводная таблица по 8 состояниям комплекса каталитическая триада силикатеина- α и Si(OH)₄.

№	Модель изменяющейся структуры	Протонация	E, ккал/моль	Kp	Парциальные заряды (АЦ)		Парциальные заряды (АЦ и Si(OH) ₄)	
					π N	τ N	π N	τ N
1		нет	-32,82	2,681*1024	-0,522	-0,502	-0,624	-0,459
2		π N	-26,69	7,339*1019	-0,635	-0,427	-0,631	-0,434
3		τ N	-28,15	8,961*1020	-0,476	-0,569	-0,561	-0,561
4		τ N, π N	-25,94	2,029*1019				
5		нет	-26,78	8,564*1019	-0,525	-0,50	-0,54	-0,512
6		π N	-12,32	2,11*1012	-0,611	-0,480	-0,606	-0,488
7		τ N	-16,53	1,479*109	-0,482	-0,527	-0,572	-0,595
8		τ N, π N	-21,92	2,067*1016	-0,613	-0,559	-0,605	-0,575

Состояние 8 характеризуется наличием 6 водородных связей между каталитической триадой и субстратом, по 2 на каждый аминокислотный остаток, с энергией связывания в - 21,92 ккал/моль. Состояние 4 не является стационарным, поскольку в ходе оптимизации конформация состояния 4, вращаясь вокруг связи C α —C β , переходит в конформацию, близкую состоянию 8 с энергией связывания в -25,94 ккал/моль.

В целом, протонированная форма азота имидазольного кольца His имеет больший (по модулю) парциальный заряд. В случае равного протонирования атомов π N и τ N, π N является более электроотрицательным атомом. Данное соотношение характерно как для свободного

АЦ, так и в комплексе с $\text{Si}(\text{OH})_4$ (таблица 1). Потенциальными состояниями, в которых возможен начальный этап активации молекулы ортокремниевой кислоты, могут быть состояния 2, 3 или 6. Наибольшая разница между двумя электроотрицательно заряженными атомами азота имидазольного кольца His наблюдается для частично протонированных состояний 2 и 6, в обоих случаях протонирован πN имидазольного кольца His.

2.1.4. ППЭ переноса H^+ в пределах электроотрицательной пары атомов АО каталитической триады силикатина- α и молекулы $\text{Si}(\text{OH})_4$. По данным оптимизации комплекса каталитической триады с молекулой $\text{Si}(\text{OH})_4$ можно выделить конфигурации АЦ, которые потенциально могут запускать активацию молекулы кремниевой кислоты и процесс конденсации. Полученные конфигурации можно разделить на группы по аминокислотным остаткам, которые могут инициировать активацию $\text{Si}(\text{OH})_4$. Первая – группа серина, характерна для состояния 3. Вторая – группа гистидина. Последнюю можно разделить на две подгруппы: протонированный азот His — потенциальный донор H^+ (состояния 2 и 7) и депротонированный азот His — потенциальный акцептора H^+ (состояния 5 и 6). Для каждого из вариантов построена ППЭ переноса H^+ и рассчитаны энергетические барьеры в пределах электроотрицательных атомов, образующих водородную связь.

В геометрии состояния 2 (протонированный πN имидазольного кольца, πN расположен кнаружи) после оптимизации расстояние между электроотрицательными атомами His πN и O $\text{Si}(\text{OH})_4$ составило $2,79\text{\AA}$. ППЭ перемещения H^+ (рисунок 2а, черный цвет) была получена путем генерации серии позиций вдоль вектора His $\pi\text{N} \rightarrow \text{O}$. При пересчете системы с учетом РСМ на ППЭ присутствуют два минимума, разделенные энергетическим барьером. Первый минимум расположен в области $1,1\text{\AA}$ от πN His, второй на расстоянии $0,98\text{\AA}$ от $\text{O} \text{--} \text{Si}(\text{OH})_4$. Энергетический барьер перемещения H^+ от πN His к $\text{O} \text{--} \text{Si}(\text{OH})_4$ составляет $14,2$ ккал/моль, в то время как энергетический барьер обратной реакции низок и составляет $1,7$ ккал/моль. Общая энергия системы при расположении перемещаемого H^+ вблизи $\text{O} \text{--} \text{Si}(\text{OH})_4$ составляет на $12,5$ ккал/моль больше, чем расположение H^+ вблизи πN His. Второй минимум энергии системы вблизи $\text{O} \text{--} \text{Si}(\text{OH})_4$ позволяет предположить, что существует определенная вероятность нахождения там H^+ . Низкий барьер обратной реакции позволит H^+ с легкостью вернуться к πN His.

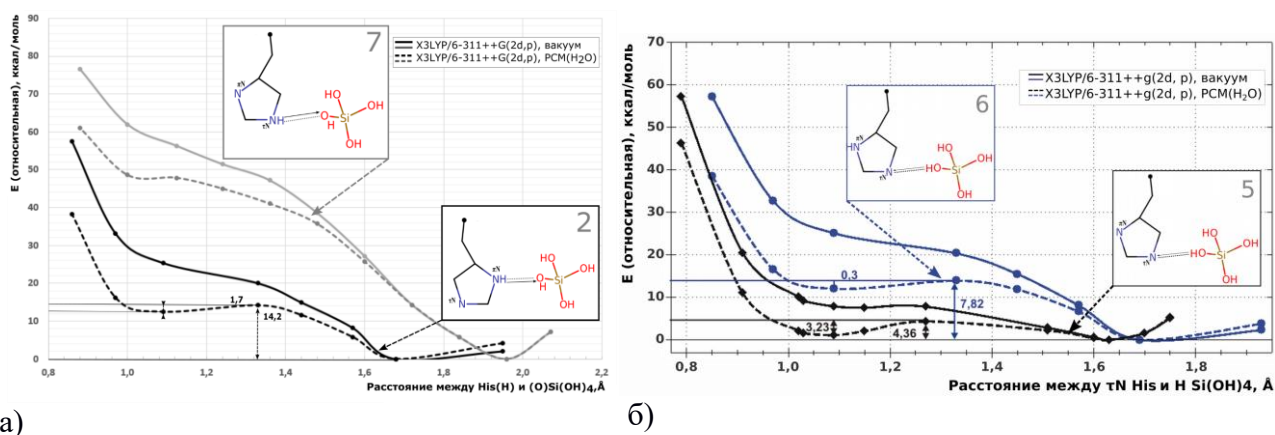


Рис. 2. ППЭ переноса H^+ между электроотрицательной парой атомов His--N и $\text{O} \text{--} \text{Si}(\text{OH})_4$. Энергии представлены относительно позиции с минимальной энергией.

Для состояния 7 (протонированный τN имидазольного кольца His, τN расположен кнаружи) расстояние между электроотрицательными атомами His τN и $\text{O} \text{--} \text{Si}(\text{OH})_4$ составило

2,9Å. ППЭ перемещения H^+ (рис. 2а, серый цвет) была получена путем генерации 11 позиций расположения H^+ (His №Н16) вдоль вектора $\tau N \rightarrow O$. В системе присутствует один общий минимум, положения H^+ , на расстоянии в 0,96Å от τN His. Минимум вблизи $O2--Si(OH)_4$ не образуется ни при расчете в вакууме, ни с использованием расчетов в РСМ.

Для состояний 5 и 6 построена ППЭ переноса H^+ от $O--Si(OH)_4$ на τN имидазольного кольца His (рис. 2б). ППЭ состояния 5 при пересчете с учетом мнимого растворителя имеет 2 минимума, соединенных энергетическим барьером прямой реакции 4,36 ккал/моль и обратной 3,23 ккал/моль. Разница в энергиях между двумя локальными минимумами составляет 1,13 ккал/моль, что может быть отнесено к погрешности метода. ППЭ состояния 6 при пересчете с учетом мнимого растворителя имеет 2 минимума энергии: первый - на расстоянии 0,98Å от $O--Si(OH)_4$, второй - на расстоянии 1,15Å, от $\tau N--His$. Энергетический барьер прямой реакции переноса H^+ составляет 7,82 ккал/моль, энергетический барьер обратной - 0,3 ккал/моль. Низкий барьер обратной реакции позволит H^+ с легкостью вернуться к $O--Si(OH)_4$. На основании рассмотренных профилей ППЭ переноса H^+ потенциальными состояниями, в которых возможен начальный этап активации молекулы $Si(OH)_4$, могут быть состояния 2 и 6, хотя оба характеризуются низким энергетическим барьером для обратной реакции. Состояние 1 и 5 могут потенциально являться начальной стадией активации кремниевых кислот, однако при нейтральном значении рН это маловероятно (Zhang *et al.*, 2020). Тем не менее такой вариант может быть возможным, если рассматривать эти формы как короткоживущие интермедиаты, которые работают как части челночных систем переноса H^+ подобно классическому механизму работы сериновых протеаз (Blow *et al.*, 1969; Fodor *et al.*, 2006). Следует также отметить, что на ППЭ переноса H^+ могут оказывать влияние АО, не включенные в модель рассматриваемого АЦ. Так присутствие Asp187 может понизить кислотность гистидина (Zhou *et al.*, 1999; Schröder *et al.*, 2012).

2.2. Области связывания силикатеина- α с кремниевыми кислотами.

2.2.1. Олигомерное разнообразия кремниевых кислот в водном растворе.

Природными субстратами для фермента силикатеина- α являются кремниевые кислоты, растворенные в водном растворе. Вопрос олигомерного состава и изомерного разнообразия до сих пор остается открытым (Sjöberg *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 2006; Vorba *et al.*, 2017). В работе проводился поиск олигомерного разнообразия природных субстратов силикатеина- α , для этого методом МД в реализованном реакционном силовом поле FG (Fueston and Garofalini, 1990). Анализ изменения доли классов олигомеров $Si_n=1-8$ в МД показывает, что в первые 0,5нс динамики происходит резкое увеличение количества небольших олигомеров. В дальнейшем их концентрация начинает плавно уменьшаться в течение всей траектории в обеих системах. В обеих системах доля димеров в ходе МД остается достаточно высокой на всем протяжении МД. Для системы45 доля димеров колеблется около~0,6, в для системы56 около~0,525. В системе45 в ходе МД наблюдается уменьшение доли тримеров и медленный рост количества олигомеров $Si_n=4-9$. В системе56 после резкого образования олигомеров $Si_n=3-5$ наблюдается медленный их спад и рост числа структур с количеством атомов кремния от 6 до 16. Большая доля кремниевых кислот приходится на небольшие олигомеры до 9 (система45) и до 16 атомов кремния (система56). За весь период МД кремниевых кислот в водном растворе обнаружены структуры с длиной цепочки до 20 (система45) и 27 атомов кремния (система56).

Общий профиль изменения долей рассмотренных олигомеров кремниевых кислот сопоставим с результатами спектроскопии ЯМР ^{29}Si и спектроскопии УФ-комбинационного рассеяния (Depla *et al.*, 2011), а так же с результатами моделирования олигомеризации кремниевых кислот при нейтральном значении pH (Rao and Gelb, 2004). Авторы работ (Rao and Gelb, 2004; Depla *et al.*, 2011) высказывают предположение, что именно димеры на этом временном промежутке играют ключевую роль в процессах олигомеризации.

Форма олигомеров сильно зависит от условий среды, в которой происходит эксперимент. Возрастание доли циклических форм наблюдается при повышении давления до 0,9 ГПа, присутствия ионов аммония и их производных (Chen *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2011), катионов тетраалкиламмония (ТАА) и тетраметиламмония (ТМА) (Knight *et al.*, 1989), а также использования насыщенных щелочных растворов (Depla *et al.*, 2011; Pilgrim *et al.*, 2018). Предпочтительное образование линейных и разветвленных форм наблюдается при нейтральном и сильно кислом pH и низком парциальном давлении (Lazaro *et al.*, 2017).

Было проведено изучение разнообразия геометрических изомеров образующихся в ходе МД олигомеров и подсчет наиболее высокочастотных вариантов. Доминирующее место занимают линейные и разветвленные структуры, среди двадцати наиболее часто встречаемых изомеров отсутствуют циклические формы (рис. 3). Картина распределения первых 9 олигомеров сопоставима для обеих систем. По результатам МД циклические формы в системе присутствуют в низком процентном соотношении, не превышающие 0,01%, для $\text{Si}_n = 3-6$, для олигомеров с большим числом атомов не зафиксированы (рис. 4).

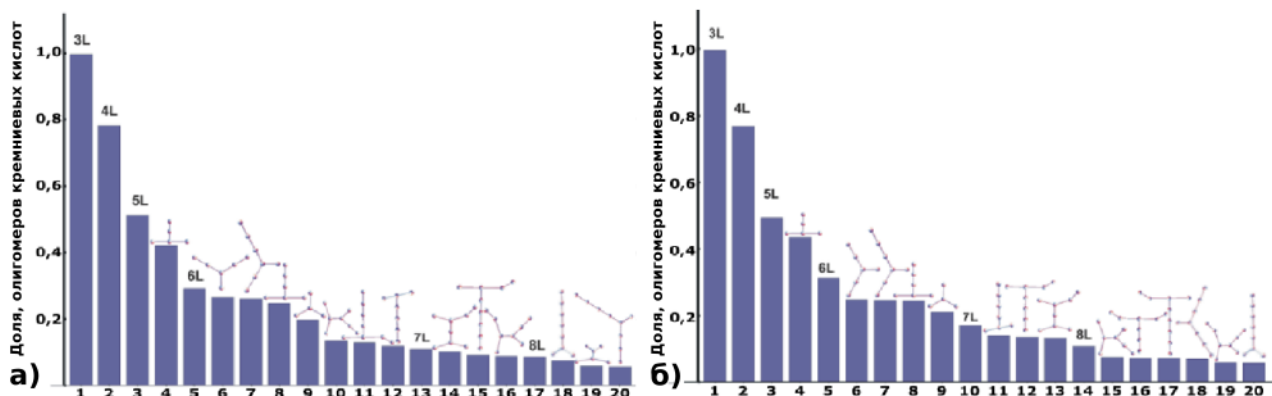


Рис. 3. Двадцать наиболее высокочастотных графовых форм изомеров кремниевых кислот, для системы 45 (а) и системы 56 (б), за 1 принята доля линейного тримера (3L).

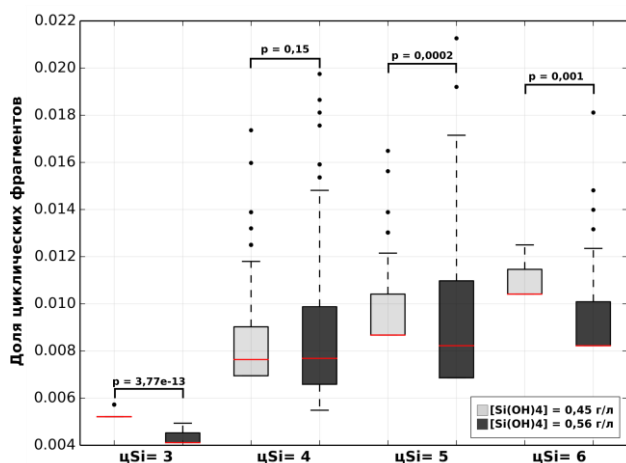


Рис. 4. Доля циклических фрагментов среди

В результате сформирована выборка из 14 олигомеров кремниевых кислот (лигандов) с количеством атомов $\text{Si}_n = 1-6$ (рис. 10), которые были оптимизированы и использованы для проведения молекулярного докинга в двух моделях силикатеина- α . Для кремниевых кислот с количеством атомов $\text{Si}_n = 1-8$ проведено полное исследование изомерного разнообразия образующихся пространственных изомеров кремниевых кислот, результаты отражены в (Изотова с соавт., 2020). В проведенном исследовании

олигомеров кремниевых кислот, $Si_n = 3-6$. обнаружены ранее не идентифицированные олигомеры.

Полученное частотное разнообразие сопоставимо как с данными экспериментов (Cho *et al.*, 2006; Borba *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019), так и с модельными расчетами (Catlow *et al.*, 1998; Belton *et al.*, 2012; Pilgrim *et al.*, 2018).

2.2.2. Оценка качества и подвижности молекулярной модели силикатеина- α и пре-силикатеина- α . Для оценки качества модели использовали метод МД. Продолжительность МД силикатеина- α составила 25нс. Изменение среднеквадратичного отклонения (RMSD) всего белка с течением времени выходит на плато на 10нс. Медиана RMSD составила 4,46Å (3,77 — 5,17Å) для диапазона 10-25нс (рис. 6а). Карта Рамачандрана для последнего шага МД (рис. 5а) показывает, что большинство двугранных углов пептидного остова (ψ и ϕ) лежат в разрешенных зонах: His163 в области β - листов, Ser25 и Gln19 в области правой α -спирали. Динамика изменения среднеквадратичной флуктуации АО (RMSF) активного центра (рис. 5б) на интервале 10-25нс показывает, что Gln19 и Ser25 менее подвижны на всем интервале МД с медианой 2,72Å (2 - 3,4Å) и 2,78Å (2,2 - 3,5Å), в то время как медиана RMSF His163 4,3Å (3,5 - 5,2Å). Динамика изменений расстояний между функциональными группами АО АЦ (рис. 6б) демонстрирует удаление Gln19 от Ser25, с ~ 4 Å до ~ 10 Å с одновременным сближением $C\alpha$ атом His163 с O--Ser25 от ~ 6 Å до ~ 3 Å, что способствует формированию устойчивой водородной связи His163- πN и HO-Ser25.

Конформационная подвижность His163 АЦ силикатеина- α может играть значимую роль в инициации активации кремниевых кислот с различной длиной цепочки (Szöri-Dorogházi *et al.*, 2012). Была проведена оценка изменения расстояний между O--Ser25 и тремя атомами His163, это: $C\alpha$, τN и πN (рис. 6а). На всей протяженности МД πN -His163 остается ориентированным к O--Ser25, несмотря на частичное вращение плоскости имидазольного кольца His163. Колебание величины водородной связи His163- πN ---HO-Ser25 находится в диапазоне 2-4Å (рис. 6а), что согласуется с экспериментом - 3,6Å (Görlich *et al.*, 2020).

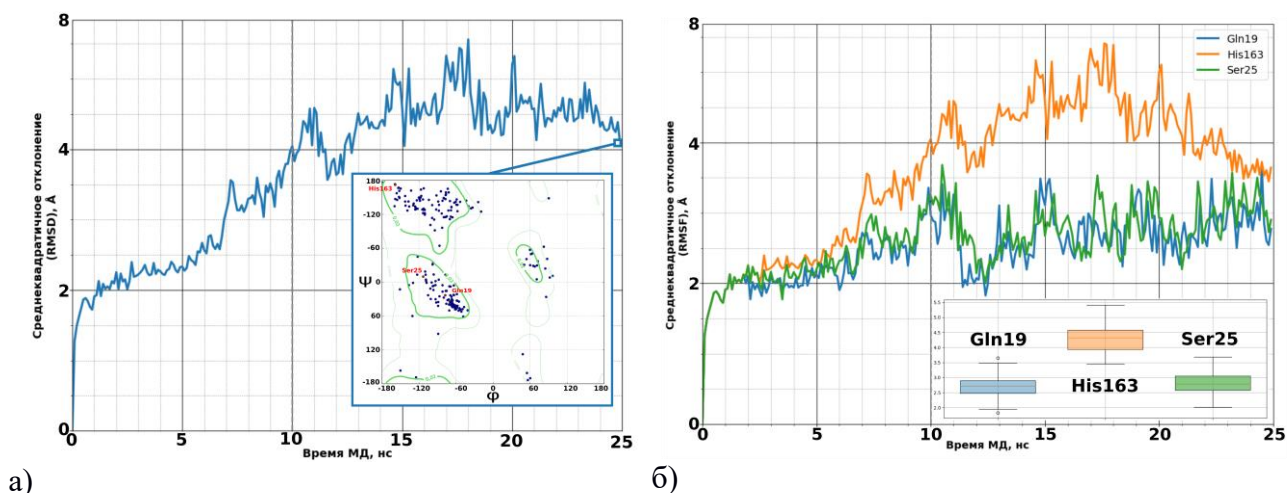
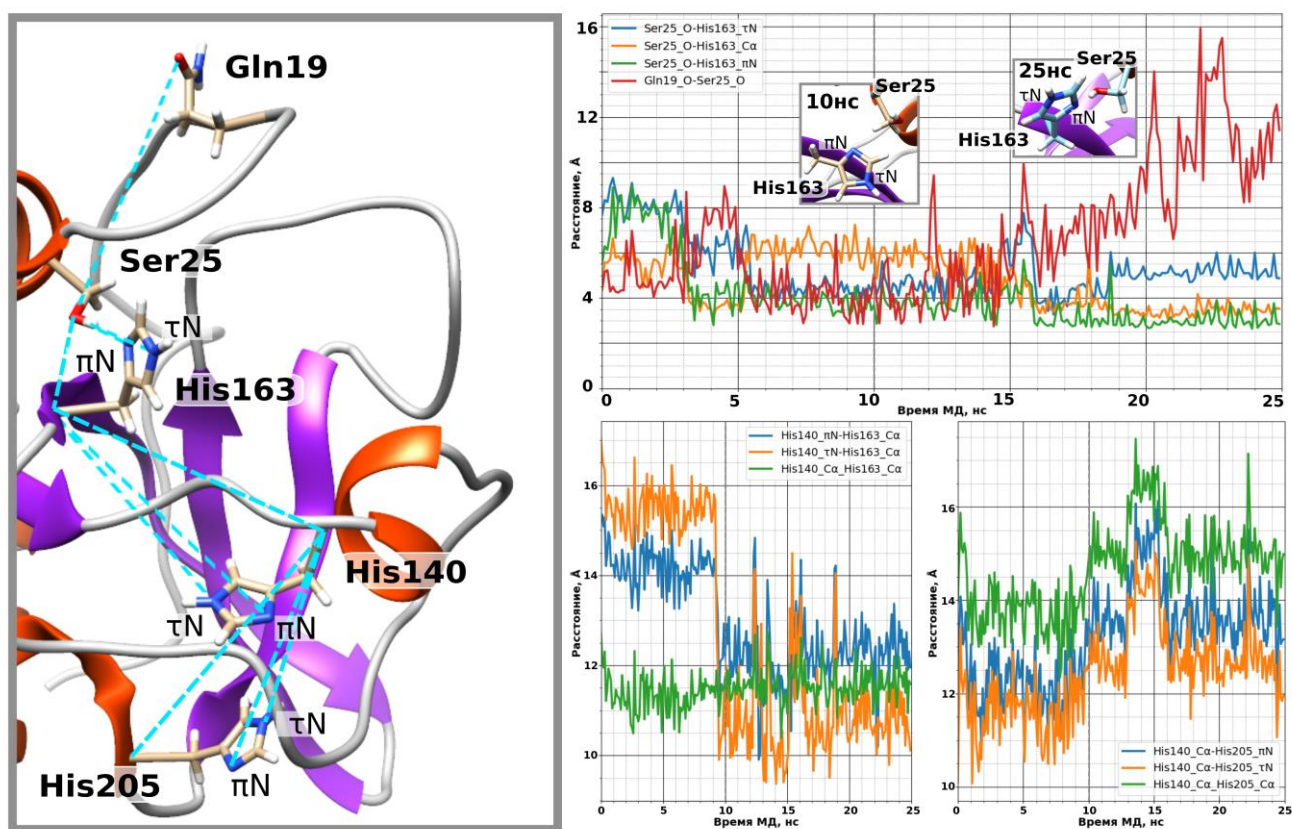


Рис. 5. Динамика изменения а) RMSD белка и б) RMSF отдельных АО в течение 25нс МД.

В целом полученная структура силикатеина- α является хорошо подготовленной для проведения молекулярного докинга, аминокислоты АЦ уравновешены и располагаются в допустимых зонах двугранных углов пептидного остова (ψ и ϕ). АО, которые предположительно осуществляют катализ, с RMSF в пределах 3,5Å.

Предположительно, в активации кремниевых кислот может участвовать система близко расположенных His, образующих цепь переноса H^+ . Пространственная структура силикатеина- α имеет область близко расположенных His, это His163, His140, His205. Динамика изменения расстояний между этими His лежит в диапазоне $\sim 11-14\text{\AA}$, что является большим для миграции H^+ в пределах одной белковой молекулы, несмотря на то, что для некоторых растворов это расстояние может достигать $10-30\text{\AA}$ (Kailaa and Hummera, 2011).

В структурах силикатеина- α (pdb 6ZQ3 и 2VHS) отсутствуют некоторые АО, поэтому по первичной последовательности была построена и оптимизирована модель пре-силикатеина- α . Предсказанная полная модель пре-силикатеина- α показала хорошую оценку качества, сопоставимую с оценками экспериментальных моделей. Структурное выравнивание предсказанной структуры пре-силикатеина- α согласуется с экспериментально полученными структурами (pdb 6ZQ3 (Görllich *et al.*, 2020) и pdb 2VHS-A (Fairched *et al.*, 2009). Кроме того предсказанная модель является более полной: в ее структуре представлен пропептидный участок и определены координаты атомов всех аминокислотных остатков зрелого белка, в структуре 2VHS-A отсутствует участок Ser174-Gln180, в структуре 6ZQ3 нет участка Ile174- Gln179 (рис. 7).



а) б)
Рис. 6. а) Схема пар расстояний между wybranными атомами; б) - Динамика изменения расстояний избранных пар атомов.

Выравнивание предсказанной структуры пре-силикатеина- α и прокатепсина L (pdb 1CS8), показало хорошее наложение пропептидного участка в районе, содержащем катепсиновый пропептид-ингибиторный домен I29 (рис. 8) (позиции аминокислот 29 - 117).

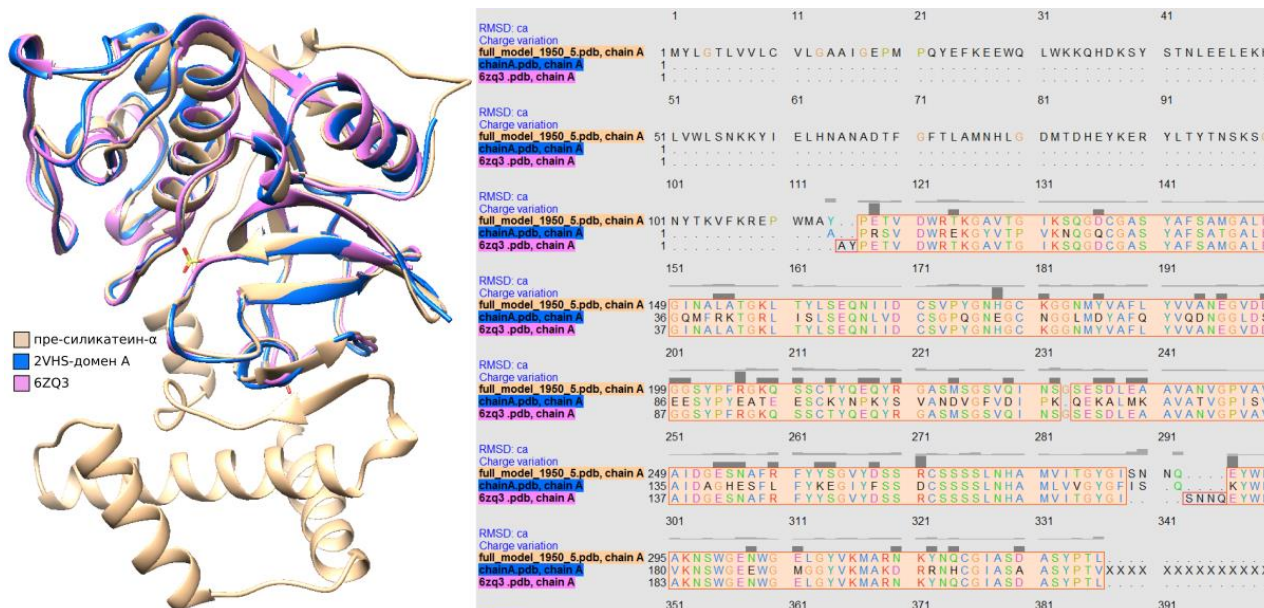


Рис. 7. Структурное выравнивание предсказанной модели пре-силикатеина- α , pdb 6ZQ3 (Görlich *et al.*, 2020) и pdb 2VHS-A (Fairched *et al.*, 2009).

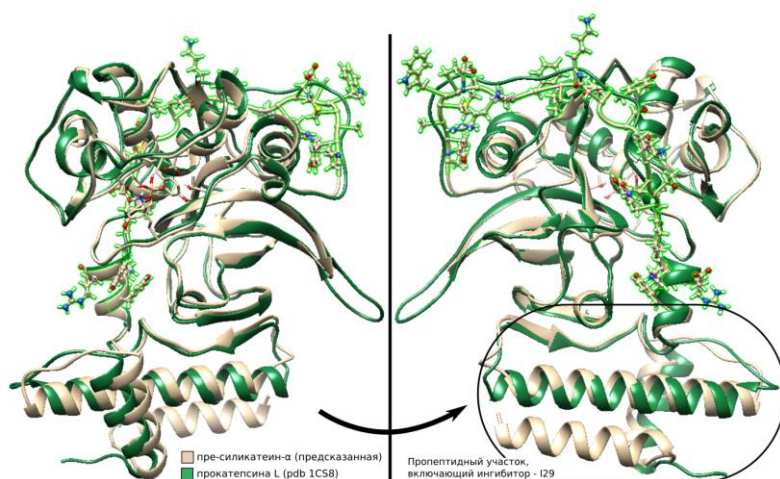


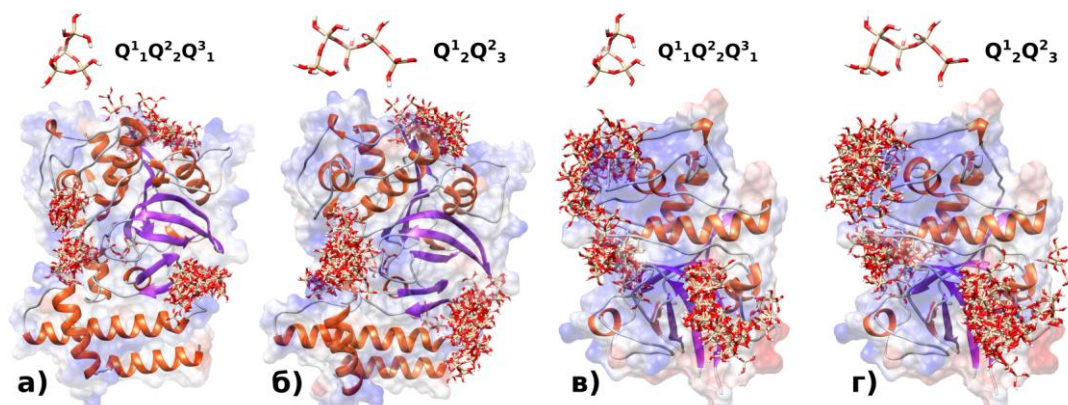
Рис. 8 Структурное выравнивание предсказанной модели пре-силикатеина- α и прокатепсина L (pdb 1CS8).

В целом предсказанная структура пре-силикатеина- α является хорошо подготовленной и сопоставима как с экспериментальными данными рентгеноструктурного анализа силикатеина- α (pdb 6ZQ3) (Görlich *et al.*, 2020) и химерным белком «4SER» катепсина L человека (pdb 2VHS) (Fairched *et al.*, 2009), так и с прокатепсина L (pdb 1CS8) и может быть использована для проведения молекулярного докинга.

2.2.3. Поиск областей связывания силикатеина- α с избранными лигандами. Поиск областей связывания силикатеина- α с 14 подготовленными кремниевыми кислотами провился в два этапа. По результатам проведения глобального поиска по всей поверхности структуры пре-силикатеина- α , можно выделить 3 области связывания: Asp68, Thr329 и Ser131, для структуры силикатеина- α были выбраны схожие регионы: Asp6, Thr94 и Ser25 (рис. 9). Для пре-силикатеин- α вблизи Asp329 выделяется одна область взаимодействий, в независимости от типа и размера лиганда. Для областей вблизи Ser131 для лигандов с количеством атомов $Si_n = 1-4$ и Thr329 для лигандов Q^1_2 , $Q^1_2Q^2_1$, $Q^2_2Q^3_2$, $Q^2_3Q^3_2$ выявлено по две области. Для силикатеина- α вокруг каждого центра формируется одна область взаимодействия.

Наибольшие значения энергии для каждого вида лигандов представлены на рисунке 10. Максимальная энергия связывания в трех регионах докирования для большинства лигандов приходится на область вблизи активного центра пре-силикатеина- α (Ser131, с

максимумом -16,1 ккал/моль). Исключение составляют Q^2_5 , $Q^2_3Q^3_2$ и $Q^1_2Q^2_4$, для которых регионом с максимальной энергией связывания является область вблизи Thr329 (с максимумом -12,55 ккал/моль). Среди групп изомеров максимальными энергиями связывания обладают комплексы фермент-линейный или разветвленный лиганд для областей Ser131 и Thr329 за исключением группы лигандов $Si_n = 4$. Для лигандов с длиной цепочки $Si_n = 1-4$ (по абсолютным значениям) и для $Si_n = 1-6$ по медианам наблюдается прямая корреляция размера лиганда и энергии связывания вблизи трех выделенных областей. Область вблизи Asp68 является наименее предпочтительной, но тем не менее энергия связывания находится в



диапазоне от -3,6 до -9,1 ккал/моль для всех рассмотренных лигандов.

Рис. 9. Области связывания лигандов с а, б) пре-силикатеином- α и с в, г) силикатеином- α

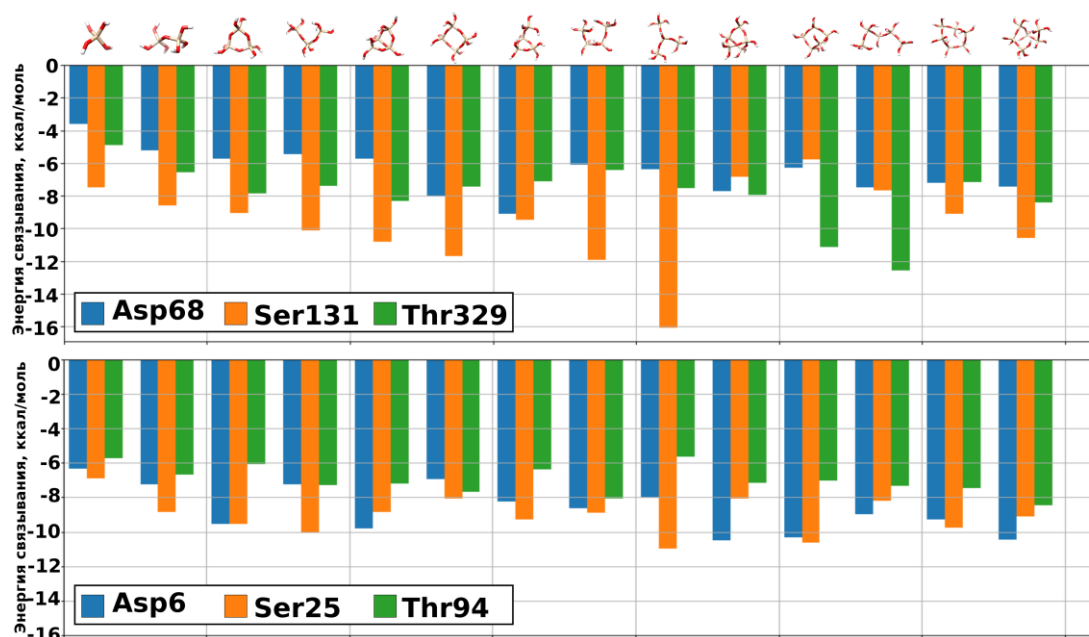


Рис. 10. Максимальные энергии связывания для каждого типа лигандов с пре-силикатеином- α (верхний), силикатеином- α (нижний).

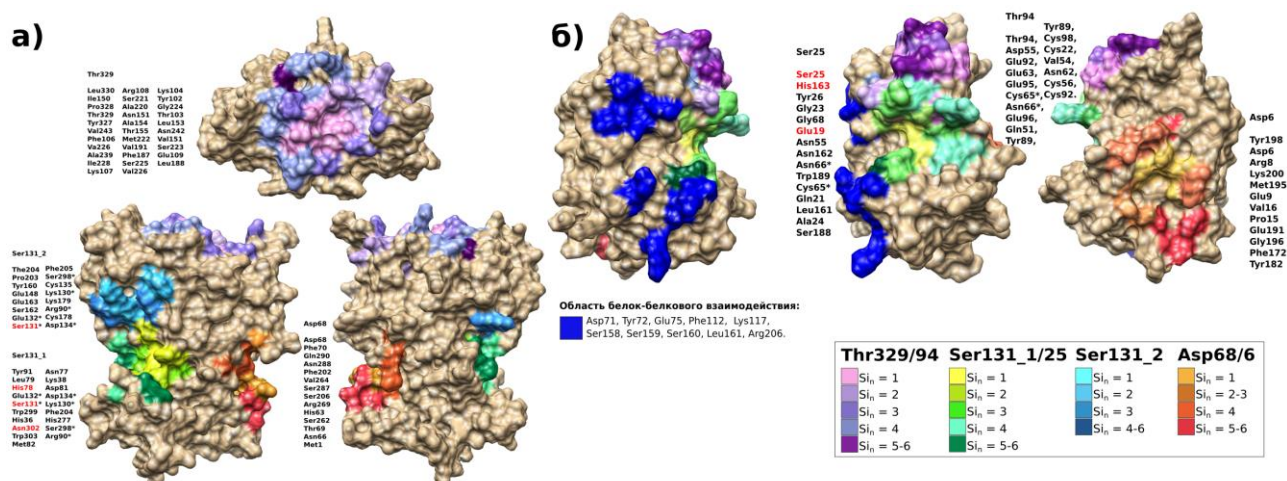
Для силикатеина- α лиганды с количеством атомов $Si_n = 1-5$ лучше связываются в области активного центра (Ser25). Среди изомеров $Si_n = 4-5$ максимальная энергия связывания приходится на линейную и разветвленную форму лигандов с максимумом для этой области в -10,96 ккал/моль. Область связывания вблизи Asp6 интересна тем, что для изомеров из групп $Si_n = 3-5$ максимальной энергией связывания обладают комплексы фермента с циклическими изомерами лигандов с разницей энергии в $\sim 1,4$ ккал/моль. Энергия

связывания лигандов вблизи Thr94 значительно ниже, чем с другими регионами, но тем не менее максимальные значения располагаются в диапазоне -5,7-8,4 ккал/моль.

Полученные значения для лигандов с длиной цепочки $Si_n=5-6$ носят предварительный характер в связи с тем, что рассмотрены лишь крайние структуры в ряду гибкости, это циклическая и линейная, обладающая максимальной конформационной подвижностью.

В целом связывание лигандов с силикатеином- α и с пре-силикатеином- α с максимальной энергией происходит вблизи АЦ. Лиганды большего размера $Si_n=5-6$ начинают эффективно связываться с областью вблизи Asp6 (для лиганд—силикатеин- α) и с областью рядом с Thr329 (лиганд—пре-силикатеин- α).

В стабилизации лигандов в областях связывания принимают участие АО, относящиеся к разным классам по строению радикала. На рисунке 11 (а, б) суммированы данные взаимодействия лигандов с АО пре-силикатеин- α и силикатеин- α . В целом следует отметить, что с увеличением размера лиганда область взаимодействия расширяется. Для пре-силикатеин- α области вблизи активного центра для малых олигомеров разделены на 2 части, которые с увеличением размеров сливаются в одну область с общими АО: Glu132, Ser131 (АО АЦУ), Asp134, Lys130, Ser298 (рис. 11а). Для силикатеин- α регион вблизи активного



центра и Thr94 имеют общие АО, это: Asn66, Cys65 (рис. 11б).

Рис. 11. Поверхность пре-силикатеин- α (а) и силикатеина- α (б), цветами раскрашены области связывания с лигандами с длиной цепочки $Si_n=1-6$.

2.2.4. Белок-белковый докинг силикатеина- α . Силикатеин- α выполняет 2 функции: ферментативную и структурообразующую (Wang *et al.*, 2014; Riesgo *et al.*, 2015). По данным рентгеноструктурного анализа кристаллов силикатеина- α (Fairhead *et al.*, 2008) и комплекса силикатеина- α с силикатами в составе спикеры (Görlich *et al.*, 2020) получены противоречивые данные, и вопросы стыковки функциональных единиц фермента остаются открытыми. В связи с этим становится важным рассмотреть сайты взаимодействия силикатина- α с идентичной субъединицей. Все полученные модели, обладающие максимальной аффинностью, докируются с одной стороны и разделяются на две группы (рисунк 12а, б): первая - силикатеин- α _A-A1 — A2 (две модели); вторая-силикатеин- α _A-A3 — A9 (семь моделей).

АЦ первой группы (силикатеин- α _A-A1—A2) располагаются перпендикулярно друг к другу, в то время как для второй группы силикатеин- α _A-A3—A9 — АЦ располагаются по

одну сторону. АО, принимающие участие в формировании комплекса рецептор-лиганд, располагаются в одной области молекулы силикатеина- α (рис. 13).

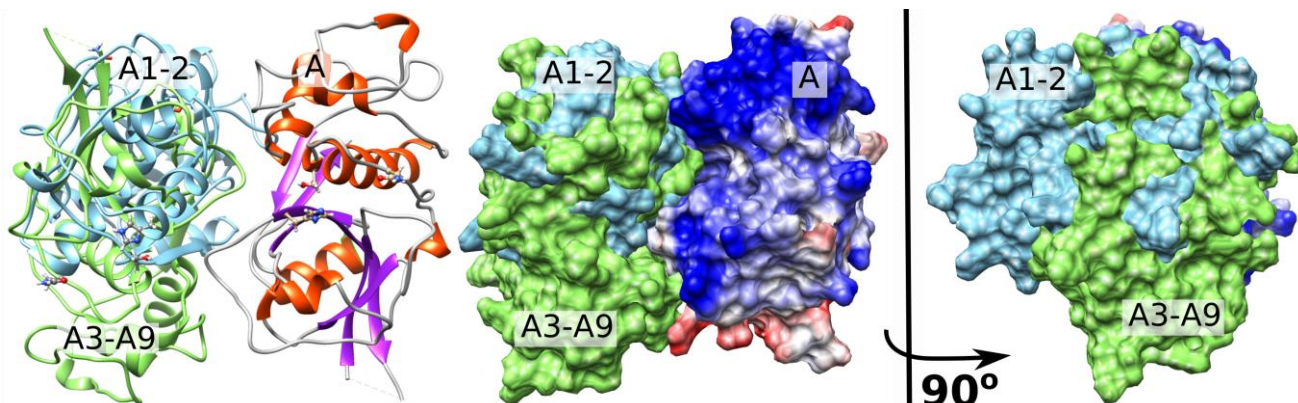


Рис. 12. Взаимное расположение двух субъединиц силикатеина- α (рецептор и лиганд), где лиганды: бирюзовая — первая группа, салатная — вторая, рецептор: сине-красно-белая.

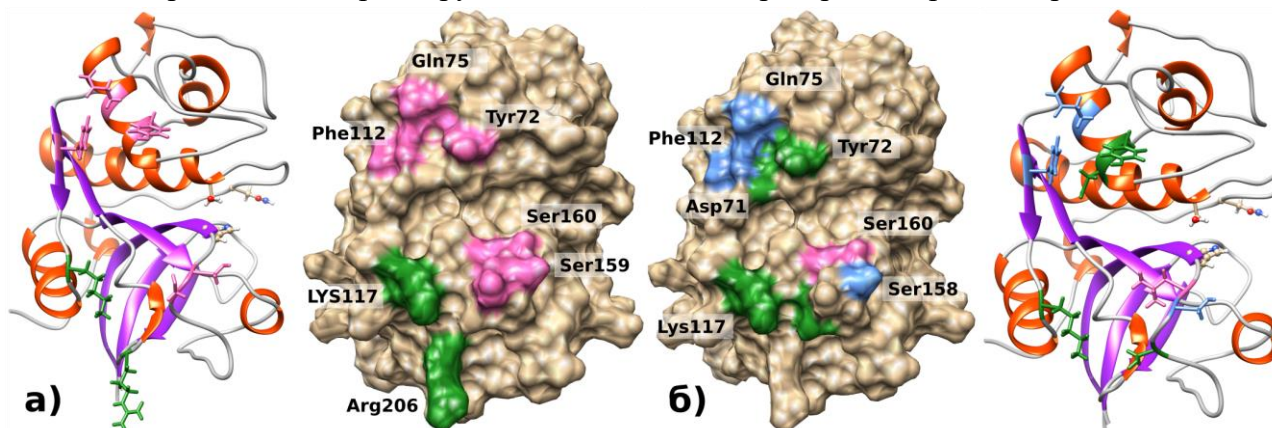


Рис. 13. АО областей связывания рецептора (силикатеин- α) и лигандов (силикатеин- α), где а) — поверхность рецептора, б) — поверхность лигандов. Условные обозначения: голубой цвет — АО первой группы, зеленый цвет — второй группы, розовый цвет — обе.

Аминокислотные остатки, принимающие участие во взаимодействии рецептора с лигандами в первой группе (рис. 13а): Glu75, Phe112, Ser160, Leu161; во второй группе: Asp71, Tyr72, Lys117, Ser158, Leu161. Со стороны молекулы лиганда АО, принимающие участие во взаимодействии для первой группы (рис. 13б): Tyr72, Glu75, Phe112, Ser159, Ser160; для второй группы: Tyr72, Glu75, Phe112, Lys117, Ser159, Ser160, Arg206. Выделенные АО частично совпадают с данными оценки поверхности силикатеина- α на степень гидрофобности, доступности для связывания с молекулой ортокремниевой кислоты (Murr and Daniel, 2005) и включают области: 72–80 АО и 151-159 АО. АО на поверхности рецептора и лиганда располагаются в общей области связывания (рис. 13). Такое расположение позволяет сделать вывод, что стыковка субъединиц силикатеина- α замыкается, формируя димер. При этом активные центры каждого силикатеина для первой группы располагаются перпендикулярно плоскости стыковки, а для второй группы располагаются по одну сторону.

Выявлено отсутствие перекрытий областей АЦ, центров потенциального связывания с природными субстратами (кремниевыми кислотами) и областью связывания со второй молекулой силикатеина- α (рис. 12б). В структуре пре-силикатеина- α выявлены

районы, которые могут регулировать его созревание в зависимости от условий, при чем кремниевые кислоты потенциально могут участвовать в этом процессе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрены 8 стартовых конфигураций каталитической триады силикатеина- α , отличающихся степенью протонированности имидазольного кольца His и поворотом его относительно связи C α –C β . Полученные комплексы каталитическая триада (His163, Ser25, Gln19) - субстрат (Si(OH)₄) отличаются энергией связывания, а также количеством и длиной водородных связей. В целом протонированная форма азота имидазольного кольца His имеет больший (по модулю) парциальный заряд. При равном протонировании атомов π N и τ N, π N является более электроотрицательным атомом. Данное соотношение характерно как для свободного активного центра, так и в комплексе с Si(OH)₄.

ППЭ для состояний 7 и 8 имеют только один минимум расположения H⁺, и данные конфигурации не приводят к его перемещению вдоль вектора водородной пары. Максимальными энергиями связывания обладают состояния, в которых имидазольное кольцо His полностью депротонировано (-32,82 ккал/моль состояние 1 и -26,78 ккал/моль состояние 5). Оптимизированный комплекс (состояние 1) является оптимальным для активации молекулы кремниевой кислоты, поскольку H⁺ переходит с O силиката на π N имидазольного кольца. Для комплекса состояния 5 имеется одна укороченная водородная связь между τ N His163---H -(Si(OH)₄), с расстоянием в 1,64Å. ППЭ перемещения H⁺ вдоль вектора этой связи имеет 2 минимума, вблизи каждого электроотрицательного атома (N и O). Энергетические барьеры прямой и обратной реакции сопоставимы и составляют 4,36 ккал/моль и 3,23 ккал/моль, соответственно. Для состояний 2 и 6 имеются 2 локальных минимума, разделенных энергетическим барьером. Состояние 6 имеет энергетический барьер перемещения H⁺ от Si(OH)₄ на τ N His163 в 7,82 ккал/моль и энергетический барьер обратной реакции в 0,3 ккал/моль. Для состояния 2 перемещение H⁺ от π N His163 на Si(OH)₄ может привести к инициации реакции конденсации кремниевых кислот по S_{N2} механизму (Brinker *et al.*, 1989; Trinh *et al.*, 2006). Данная ППЭ характеризуется высоким энергетическим барьером прямой реакции переноса H⁺ в 14,2ккал/моль и низким для обратной 1,7ккал/моль. Энергия активации для молекулы Si(OH)₄ по S_{N2} механизму приходится на затраты 11,3 ккал/моль, в то время как энергия активации по на боковому механизму несколько выше и соответствует 17,3 ккал/Моль (Brinker *et al.*, 1989; Trinh *et al.*, 2006).

При сравнении полученных результатов следует учитывать, что погрешность вычисления энергии системы методом DFT в базисном наборе X3LYP может достигать 4-5 ккал/моль (Kozuch and Martin, 2011). Поэтому энергетический барьер в 14,2 ккал/моль может быть сопоставим с энергией активации по S_{N2} механизму. Кроме того полностью протонированные и депротонированные состояния азотов имидазольного кольца His для водных растворов с нейтральным значением рН маловероятны (Zhang *et al.*, 2011). Это приводит к снижению вероятности инициации активации кремниевой кислоты АЦ в следующих состояниях: 1, 4, 5 и 8. С учетом того, что при рН = 6,6 наступает динамическое равновесие между таутомерными формами имидазольного кольца His, где 80% приходится на протонирование π N и 20% на — τ N, и то, что ППЭ перемещения H⁺ для состояний 2 и 6 имеют два энергетических минимума, позволяют предположить, что именно протонирование π N имидазольного кольца является предпочтительным для инициации

реакции активации молекулы субстрата. В то время как вращения имидазольного кольца His относительно связи Ca –Cβ, приводит к увеличению барьеров прямой и обратной реакции примерно в 2 раза.

Для проведения поиска областей связывания силикатеина-α с кремниевыми кислотами был сформирован набор наиболее высокочастотных и некоторых интересных форм олигомеров кремниевых кислот. Для этого была сформирована система, состоящая из равноудаленных молекул Si(OH)₄, растворенная в воде (TIP3P), и реализовано силовое поле FG. Исследование зависимости олигомерного разнообразия и долей олигомеров от концентрации Si(OH)₄ в растворе для двух систем, отличающихся концентрацией мономеров показаны общие тенденции доминирования линейных и разветвленных форм олигомеров исхода распределения высокочастотных олигомеров. Для обеих систем на начальном этапе моделирования (менее 0,5 нс) характерен рост количества олигомерных структур с содержанием атомов (Si_n=3–5). В диапазоне 0,5–3нс наблюдается медленный рост количества олигомеров с более длинной цепочкой, а именно (Si_n=6–8). Установлено, что на протяжении всего эксперимента сохраняется высокое значение доли димеров. За весь период МД до ~98% атомов Si имели степень координации IV. Наличие в изученных системах атомов Si со степенью координации V может говорить об образовании промежуточных комплексов в процессе полимеризации кремниевых кислот.

В рамках исследования определены траектории формирования циклического тримера, бициклического тетрамера и олигомера типа Q¹₂Q²₂Q⁴₁, для которых получены поэтапные схемы образования и предложен механизм их образования, подразумевающий сценарий их формирования из димерных структур. Отметим, что структура и представленность олигомера типа Q¹₂Q²₂Q⁴₁ получены впервые в рамках МД-моделирования и на данный момент такая структура не идентифицирована при помощи экспериментальных методов.

Полученные результаты позволяют заключить, что реакционное силовое поле FG на рассмотренном временном интервале достаточно корректно описывает геометрию и процесс олигомеризации с точки зрения структуры олигомеров кремниевых кислот и их содержания в водном растворе. Данное силовое поле может быть использовано для дальнейшего изучения олигомерного состава и молекулярного механизма образования кремниевых структур.

Избранные олигомеры были оптимизированы и использованы для проведения молекулярного докинга с целью поиска областей связывания силикатеина-α с силикатами. Лиганды с длиной цепи Si_n1-6 с силикатеином-α имеют три региона связывания вблизи АЦ: рядом с Asp6, Ser25 и Thr94 с максимальной аффинностью в -16,1 ккал/моль для пре-силикатеина-α и -10,96 ккал/моль. Максимальной аффинностью к силикатеину среди лигандов обладают линейные и разветвленные формы. Полярные и положительно заряженные АО пропептидного фрагмента (позиции 1..116) участвуют во взаимодействии с лигандами во всех 3-х выявленных областях. При докировании малых лигандов Si_n=1-4 в структуру пре-силикатеина-α область связывания вблизи Ser131 разделяется на две группы, которые объединяются в одну область с увеличением размера лиганда. Лиганды Q²₅, Q²₃Q³₂ и Q¹₂Q²₄ имеют максимальную аффинность к региону вблизи Thr329, циклические изомеры Si_n=3-5 имеют максимальную аффинность к району Asp6. При образовании димеров силикатеина-α области стыковки не перекрываются с регионами адгезии кремниевых кислот.

Таким образом, проведенная оценка разнообразия кремниевых кислот в водном растворе определила спектр потенциальных природных субстратов силикатеина-α. Изучение

биофизических особенностей конфигурации аминокислотных остатков активного центра силикатеина- α и областей его взаимодействия с силикатами позволило предложить наиболее вероятные пути активации кремниевых кислот на начальном этапе биосилификации.

ВЫВОДЫ

- 1) Предпочтительными конфигурациями каталитической триады силикатеина- α , которые могут инициировать реакцию конденсации $\text{Si}(\text{OH})_4$, являются частично протонированные формы имидазольного кольца His по πN (состояния 2 и 6).
- 2) Реакционное силовое поле Feuston и Garofalini позволяет моделировать разнообразие природных лигандов силикатеина- α , при этом длина ковалентной связи Si-O, валентные углы Si-O-Si и O-Si-O сопоставимы с экспериментальными данными; в ~98% случаев Si в составе лигандов имеет VI координационное число, что поддерживает тетраэдрическую форму силикатов; время жизни силанольных связей составило ~110пс, а силоксановых связей ~25пс.
- 3) Полученное графовое изомерное разнообразие кремниевых кислот со степенью олигомеризации $\text{Si}_n = 3-5$ полностью согласуется с экспериментальными данным, кроме этого идентифицированы не выявленные в экспериментах структуры: для $\text{Si}_n = 5$ – 1 структура, для $\text{Si}_n = 6$ – 23 структуры, для $\text{Si}_n = 7$ – 56 структур, среди $\text{Si}_n = 8$ – 108 структур.
- 4) Кремниевые кислоты с длиной цепи $\text{Si}_n=1-6$ с силикатеином- α имеют три региона связывания вблизи АЦ: рядом с Asp6, Ser25 и Thr94 с максимальной аффинностью в -16,1 ккал/моль для пре-силикатеина- α и -10,96 ккал/моль для силикатеина- α . Максимальной аффинностью к силикатеину среди изомеров лигандов обладают линейные и разветвленные формы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2021619675. Программа для анализа траекторий молекулярной динамики и визуализации графовых моделей пространственных структур / **Е. Д. Изотова** – Заявка №20216128444. Дата поступления 31 мая 2021г. Зарегистрировано в Реестре программ для ЭВМ 15 июня 2021г.
- 2) **Изотова Е.Д.** Молекулярная динамика кремниевых кислот в водном растворе: качественная и количественная характеристика олигомеров /**Е.Д. Изотова**, М.А. Рудакова, Н.И. Акберова // Ученые записки Казанского университета. Серия Физико-математические науки. - 2020. - Т. 162.- № 1. - С. 5-26. (Scopus, Web of Science).
- 3) **Изотова, Е.Д.** Конформационная подвижность активного центра мутантной формы 4SER катепсина-L: молекулярная динамика и ab initio вычисления / **Е.Д. Изотова**, Т.В. Багаева// Доклады Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика».- Пушино: ИМПБ РАН.- 2018.- Т. 7.- Статья №.- e74. doi: 10.17537/icmbb18.45 (РИНЦ).
- 4) Tarasov D. Optimal Approach Trajectories for a Hydrogen Donation Tool in Positionally Controlled Diamond Mechanochemistry / D. Tarasov, **Е. Izotova**, D. Alisheva, N. Akberova, R. A. Freitas//Journal of Computational and Theoretical Nanoscience.- 2013.- Vol. 10.- №. 2.- p.1-9. (Scopus, Web of Science).
- 5) Тарасов, Д. С. Молекулярная динамика и свободная энергия связывания линолевой кислоты с ДНК в водном растворе / Д. С. Тарасов, М.Я. Ибрагимова, **Е. Д. Изотова**, Н. И. Акберова, Р. И. Жданов // Доклады Академии наук. Серия - биохимия, биофизика, молекулярная биология.- 2012. - Т. 446.- № 2. - С. 226-231. (Scopus, Web of Science).

- 6) Tarasov, D.S. Gramm-software package for molecular dynamics on graphical processing units / D. S. Tarasov, **Izotova E. D.**, Alisheva D. A, N. I Akberova //Mathematical Models and Computer Simulations.- 2010.- Vol. 2.- I. 1.- p. 46-54. (Scopus, Web of Science).
- 7) Акберова Н.И. Сравнение методов расчета электростатических взаимодействий в алгоритмах для графических акселераторов / Д.И. Алишева, **Е.Д. Изотова**, Д.С. Тарасов // Ученые записки казанского государственного университета. Естественные науки.- 2008.- Т. 150.- кн. 2.- С. 71-81. (Scopus, Web of Science).
- 8) **Изотова, Е. Д.** Области взаимодействия ортокремниевой кислоты и силикатеина-а *T. Aurantium* / Е. Д. Изотова, Н. И. Акберова // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2021: сборник междунар. науч конф. - Севастополь., 2021. - Вып. 16. - С. 69-70. (Материалы конференции)
- 9) **Изотова, Е.Д.** Оценка времени жизни силанольных и силоксановых связей в процессе олигомеризации кремниевых кислот / Е.Д. Изотова, М.А. Рудакова, М.А. Крутьева, Н.И. Акберова // X Национальная кристаллохимическая конференция.- Приэльбрусье.- 2021.- 174-175 с. (Материалы конференции).
- 10) Чапланов В.В. Расчеты энергий конформаций олигомеров ортокремниевых кислот с помощью методов квантовой химии / Чапланов В.В., Петрова А.А., Рудакова М.А., **Изотова, Е.Д.** // IX Всероссийская молодежная научная конференция «функциональные материалы: синтез, свойства, применение» СПб.: ЛЕМА, 2020. – С. 180 (Материалы конференции).
- 11) **Изотова, Е.Д.** Сохранение геометрии силикатных олигомеров в процессе молекулярной динамики / **Е.Д. Изотова**, М.А. Рудакова, Н.И. Акберова // Проблемы теоретической и экспериментальной химии : сборник XXX росс. молодежной научной конф. - Екатеринбург., 2020. - Вып.15. - С. 271. (Материалы конференции).
- 12) **Изотова, Е.Д.** Детерминистическая модель полимеризации кремниевых кислот в водном растворе / Е.Д. Изотова, Д.С. Тарасов // XII Всероссийский съезд по фундаментальным проблемам теоретической и прикладной механики: сборник всеросс. съезда.- Уфа.- 2019.- секция I-1.- С. 78-81 (Материалы конференции).
- 13) **Изотова, Е.Д.** Оптимальные области взаимодействия силикатеина- α и молекулы ортокремниевой кислоты / Е.Д. Изотова, Н.И. Акберова // Сборник тезисов 23-ой Международной Пущинской школы-конференции Молодых ученых «Биология - наука XXI века».- Пущино.- 2019.- 408 с. (Материалы конференции).
- 14) **Изотова, Е.Д.** Квантово-химические расчеты процесса переноса H^+ между H_4SiO_4 и πN -имидазольного кольца гистидина с использованием теории функционала плотности/ Е.Д. Изотова, Т.В Багаева//Информационные технологии и системы (ИТиС) междисциплинарная школа-конференция. - Казань. - 2018.- С. 499 — 501. (Материалы конференции).
- 15) **Изотова, Е.Д.** Теоретическое исследование геометрии и энергии связывания каталитической триады силикатеина- α с молекулой ортокремниевой кислоты/Е.Д. Изотова, Т.В. Багаева//VII Всероссийская конференция по структуре и энергетике молекул: сборник всеросс. конф. - Иваново.- 2018. - С. 26. (Материалы конференции).
- 16) **Изотова, Е.Д.** Квантово-химические расчеты sn_2 механизма конденсации двух молекул ортокремниевой кислоты в водных растворах/ Е.Д. Изотова, Т.В. Багаева//III Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века».- 2018.- С. 243. (Материалы конференции).