

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

*На правах рукописи*



**Кордонская Юлия Владимировна**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА ОЛИГОМЕРОВ БЕЛКОВ В  
КРИСТАЛЛИЗАЦИОННЫХ РАСТВОРАХ**

Специальность 1.3.8. Физика конденсированного состояния

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва 2026

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

**Научный руководитель:** **Дьякова Юлия Алексеевна,**  
доктор физико-математических наук, член-корреспондент РАН, директор НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва.

**Официальные оппоненты:** **Томилин Феликс Николаевич,**  
доктор физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории физики магнитных явлений Института физики имени Л.В. Киренского Сибирского отделения РАН, г. Красноярск;

**Штыкова Элеонора Владимировна,**  
доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биоэлектрохимии института физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН, г. Москва.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный Научный Центр Российской Федерации Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва.

Защита диссертации состоится 4 июня 2026 г., начало в 15:00, на заседании диссертационного совета 02.1.003.01 на базе НИЦ «Курчатовский институт» по адресу: 123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИЦ «Курчатовский институт» и на сайте: [www.nrcki.ru](http://www.nrcki.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
02.1.003.01, к.ф.-м.н.



А.В. Емельянов

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Белки играют ключевую роль во всех жизненно важных процессах, выполняя широкий спектр функций, строго детерминированных их трехмерной структурой [1]. Установление пространственной структуры белков необходимо для понимания механизмов их функционирования, требующегося при решении множества прикладных задач — от разработки лекарственных препаратов до создания биосенсоров.

Рентгеноструктурный анализ является ведущим методом определения атомарной структуры биомакромолекул: более 80% всех экспериментально установленных белковых структур были получены с его использованием. Однако применение этого метода ограничено необходимостью предварительного получения высококачественных монокристаллов белков. Процесс белковой кристаллизации остается сложной, во многом эмпирической, задачей, что существенно тормозит развитие структурной биологии. Рационализация методологии выращивания белковых кристаллов требует фундаментального понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе их формирования.

Современные экспериментальные исследования [2–4] выявили наличие предкристаллизационной фазы белкового раствора, характеризующейся образованием специфических белковых олигомеров — кластеров-прекурсоров, представляющих собой фрагменты будущей кристаллической решетки. Эти агрегаты играют ключевую роль на ранних этапах кристаллизации, поскольку присутствие стабильных прекурсоров в определенной концентрации в растворе является необходимым условием образования кристалла. Дальнейший прогресс в разработке теоретических основ белковой кристаллизации и создании методик, предсказывающих ее оптимальные условия, требует детального изучения природы, структурной организации и динамического поведения (в частности, оценке стабильности) обнаруженных предкристаллизационных олигомеров.

Исследование структурно-динамических характеристик кластеро-прекурсоров на атомарном уровне, как правило, затруднено или недоступно в рамках физических экспериментов. В то же время вычислительный метод молекулярной динамики (МД) предоставляет уникальные возможности для изучения таких состояний белков, поскольку позволяет исследовать особенности поведения и оценивать структурную стабильность олигомеров в различных условиях с атомарной детализацией.

Применимость МД для изучения предкристаллизационных растворов белков была успешно продемонстрирована на примере лизоцима [5]. Тем не менее, для выявления общих закономерностей поведения кластеро-прекурсоров и разработки надежных предсказательных подходов получения кристаллов необходимо систематическое изучение процесса самоорганизации молекул для широкого круга белков.

Особый интерес представляет класс термофильных ферментов, поскольку для понимания их функциональных механизмов важно получение кристаллов в условиях их каталитической активности, а именно, при нетипичных для белковой кристаллизации повышенных температурах. Оценка стабильности кластеро-прекурсоров кристаллов белков в широком температурном диапазоне на основе результатов МД открывает перспективы выявления новых, ранее не исследованных температурных интервалов, перспективных для кристаллизации.

Таким образом, развитие и применение методов молекулярного моделирования для детального изучения структурно-динамических особенностей предкристаллизационных олигомеров в растворе способствует фундаментальному пониманию процессов самоорганизации биомолекул и предоставляет инструменты теоретического предсказания оптимальных условий кристаллизации белков для направленного дизайна кристаллизационных экспериментов.

**Цель работы:** развитие и применение подхода к установлению особенностей самоорганизации белковых молекул в кристаллизационных растворах, основанного на оценке стабильности олигомеров белков с помощью метода молекулярной динамики.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. Оценить возможность использования силового поля MARTINI – крупнозернистого описания модели, позволяющего ускорить расчеты по сравнению с атомистическим подходом, – для моделирования кристаллизационных растворов белков.
2. Определить минимальные размеры ячейки моделирования, исключающие артефакты периодических граничных условий (для ускорения МД-расчетов кристаллизационных растворов белков).
3. Уточнить структуру кластеров-прекурсоров (олигомеров) кристаллов протеиназы К и термолизина.
4. Определить влияние температуры на стабильность выявленных кластеров-прекурсоров кристаллов протеиназы К и термолизина (в диапазонах температур 20–80°C и 10–90°C соответственно).

### **Научная новизна**

В работе впервые:

1. Доказана возможность использования крупнозернистого силового поля MARTINI для МД-моделирования олигомеров глобулярных белков в кристаллизационных растворах;
2. Определены минимально допустимые размеры ячейки моделирования для исследования олигомеров глобулярных белков в кристаллизационных растворах с помощью МД;
3. Установлены наиболее стабильные олигомеры (кластеры-прекурсоры), выделенные из кристаллических структур протеиназы К и термолизина;

4. Определена зависимость стабильности выявленных кластеров-прекурсоров кристаллов протеиназы К и термолизина от температуры. Обнаружено, что они стабильны в широком диапазоне температур: 20–60 и 10–90°C соответственно;
5. Получены кристаллы протеиназы К после инкубирования ее раствора при 60°C – температуре, предсказанной с помощью МД;
6. Показана предсказательная способность развитого подхода к установлению новых перспективных температур белковой кристаллизации, основанного на оценке стабильности кластеров-прекурсоров кристаллов белков с помощью МД.

### **Практическая значимость**

Развитый в работе подход к исследованию кристаллизационных растворов белков, основанный на сочетании крупнозернистой и атомистической МД, позволяет раскрыть детали механизмов кристаллизации, недоступные или труднодоступные для экспериментальных измерений.

Данный подход предоставляет возможность моделирования различных этапов белковой кристаллизации за счет оптимального выбора силового поля (уровня детализации модели), позволяя:

- моделировать длительные процессы (например, агрегацию олигомеров) ускоренно с помощью крупнозернистой МД;
- моделировать локальные процессы (например, диссоциацию олигомеров) с помощью атомистической МД при оптимальных параметрах (минимально допустимых размерах ячейки моделирования).

Получение кристаллов протеиназы К после инкубации при 60°C – температуре, предсказанной на основе анализа термостабильности кластера-прекурсора ее кристалла с помощью МД, – не только подтверждает перспективность развитого в работе МД-подхода для теоретически обоснованного выбора температуры кристаллизации белков, но и позволит установить пространственную структуру протеиназы К в нативном состоянии.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Подтверждение применимости крупнозернистого силового поля MARTINI для ускоренного молекулярно-динамического моделирования поведения олигомеров глобулярных белков в кристаллизационных растворах.
2. Для корректной оценки стабильности олигомеров глобулярных белков в кристаллизационных растворах на основе атомистического молекулярно-динамического моделирования, расстояние между атомами белка и гранью периодической ячейки должно составлять не менее одного радиуса отсечки невалентных взаимодействий.
3. Среди шести типов димеров, выделенных из кристаллической структуры протеиназы К, и четырех типов гексамеров, выделенных из кристаллической структуры термолизина, наибольшей стабильностью (по данным молекулярно-динамического моделирования) обладают димер типа «Е» и гексамер типа «А».
4. Димер типа «Е» протеиназы К и гексамер типа «А» термолизина сохраняют стабильность в температурных пределах 20–60 и 10–90°C соответственно.

### **Личный вклад автора**

Все результаты, представленные в работе, получены лично автором или при ее непосредственном участии.

Автор непосредственно принимала участие в построении всех указанных в диссертационной работе моделей олигомеров белков (лизоцима, протеиназы К и термолизина); проведении их моделирования методом молекулярной динамики; обработке, анализе и интерпретации результатов вычислений.

Обсуждение результатов и их интерпретация проводились совместно с научным руководителем и соавторами публикаций.

## Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на международных и российских конференциях:

1. **Ю.В. Кордонская**, В.И. Тимофеев, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, Д.Д. Подшивалов, А.С. Бойкова, М.В. Ковальчук «Исследование начальной стадии кристаллизации лизоцима методом молекулярной динамики» / 53-я Школа ПИЯФ по Физике Конденсированного Состояния (Москва, 2019);

2. **Кордонская Ю.В.**, Тимофеев В.И., Ильина К.Б., Марченкова М.А., Подшивалов Д.Д., Бойкова А.С., Дьякова Ю.А., Писаревский Ю.В., Ковальчук М.В. «Исследование начальной стадии процесса кристаллизации белка лизоцима методом молекулярной динамики» / VIII-я международная молодежная научная школа-конференция «Современные проблемы физики и технологий», НИЯУ МИФИ (Москва, 2019);

3. **Ю.В. Кордонская**, В.И. Тимофеев, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Моделирование молекулярной динамики олигомеров лизоцима в растворе при различных температурах» / XVI Курчатовская междисциплинарная молодежная научная школа, НИЦ "Курчатовский институт" (Москва, 2019);

4. **Ю.В. Кордонская**, В.И. Тимофеев, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Исследование стабильности олигомеров лизоцима в предкристаллизационном растворе методами молекулярной динамики» / 63-я Всероссийская научная конференция МФТИ (2020);

5. **Yu.V. Kordonskaia**, V.I. Timofeev, Yu.A. Dyakova, M.A. Marchenkova, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk «Precipitant ions influence on lysozyme mono- and oligomers stability investigated by molecular dynamics simulation» / Moscow Conference on Computational Molecular Biology (Moscow, 2021);

6. **Yu.V. Kordonskaia**, V.I. Timofeev, Yu.A. Dyakova, M.A. Marchenkova, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk «Study of the behaviour of lysozyme oligomers

in solutions by the molecular dynamics method at different temperatures» / 25th General Assembly and Congress of the International Union of Crystallography 2021 (Prague, 2021);

7. **Ю.В. Кордонская**, В.И. Тимофеев, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, Ю. В. Писаревский, М. В. Ковальчук «Влияние размера ячейки моделирования и концентрации ионов осадителя на поведение димера тетрагонального лизоцима» / Кластер конференций 2021 (Иваново, 2021);

8. **Ю.В. Кордонская**, В.И. Тимофеев, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, Ю. В. Писаревский, М. В. Ковальчук «Изменение свободной энергии при формировании кристаллического контакта между мономерами лизоцима при различных физико-химических условиях» / 64-я Всероссийская научная конференция МФТИ (Москва, 2021);

9. **Ю.В. Кордонская**, В.И. Тимофеев, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Молекулярная динамика олигомеров лизоцима в кристаллизационных растворах с различными осадителями» / XVII Международная научная конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2022» (Севастополь, 2022);

10. **Ю.В. Кордонская**, В.И. Тимофеев, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Определение кластера-прекурсора кристаллов белка протеиназы К» / OPENBIO-2022 (Наукоград Кольцово, 2022);

11. **Ю.В. Кордонская**, В.И. Тимофеев, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Установление кластера-прекурсора кристалла олигопептидазы» / Синхротронные и нейтронные методы исследования конденсированных фаз (Москва, 2024);

12. **Ю.В. Кордонская**, В.И. Тимофеев, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Кластеры-прекурсоры кристаллов протеиназы К и термолизина: определение и температурная стабильность» / Материалы будущих технологий (Москва, 2025).

**Публикации:** основные результаты, вошедшие в диссертационную работу, изложены в 7-ми публикациях, размещенных в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК (и индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science).

**Структура и объем диссертации:** диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка цитируемой литературы из 108 наименований. Диссертация содержит 119 страниц, 29 рисунков и 5 таблиц.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность изучения механизмов белковой кристаллизации с помощью метода МД в современном научном контексте; сформулирована цель и поставлены задачи, решаемые в диссертационной работе; перечислены положения, выносимые на защиту; аргументированы научная новизна и практическая значимость полученных результатов; приведены сведения об апробации результатов работы (конференциях) и публикациях по теме диссертации.

**Первая глава** содержит аналитический обзор литературы, включающий 4 раздела:

- **первый** посвящен описанию основных *вычислительных подходов к предсказанию белковых структур*, в частности основанных на алгоритмах машинного обучения (программа AlphaFold2), их возможностей и области применимости; показано, что такие методы являются мощным дополнением, но не альтернативой экспериментальным техникам установления структуры белков;
- во **втором** изложены *современные представления о процессе белковой кристаллизации*, охватывающие термодинамические аспекты, фазовую диаграмму, стадии нуклеации и роста кристаллов. Описаны основные сложности, возникающие при получении кристаллов белков высокого дифракционного качества, в значительной степени эмпирический характер

подбора условий кристаллизации и подход к его рационализации с помощью методов малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР);

- третий рассматривает метод МД как инструмент исследования биомолекулярных систем. Приведены его физико-математические основы и подходы к ускорению МД-расчетов, включая крупнозернистое моделирование. Раскрыта роль силовых полей и периодических граничных условий;
- в четвертом представлен анализ работ по исследованию структуры кристаллизационного раствора лизоцима с применением методов МУРР и МД. Изложены ключевые характеристики ранней стадии кристаллизации лизоцима: образование его димеров и октамеров (МУРР); подтверждение нестабильности тетрамеров и гексамеров (МД); установление стабильного типа октамера и особенностей влияния ионов хлорида натрия на стабильность олигомеров лизоцима (МД).

Во **второй** главе описана методика проведения МД-моделирования и представлены результаты решения методологических задач, направленных на оптимизацию и расширение возможностей МД-моделирования кристаллизационных растворов белков.

В первом разделе изложен подробный протокол атомистического МД-моделирования, реализованный в программном пакете GROMACS [6] с использованием силового поля Amber ff99SB-ILDN [7]. Алгоритм включает построение начальной модели олигомеров путем их выделения из кристаллических структур, помещение этой модели в виртуальную ячейку с раствором, воспроизводящим условия кристаллизации, и моделирование движения всех атомов системы на основе решения уравнений Ньютона с шагом интегрирования 2 фс. Поведение олигомеров анализировалось с помощью оценки изменения их формы, размеров и внутренней подвижности путем вычисления площади межмолекулярных контактов и стандартных структурно-динамических характеристик (среднеквадратичного отклонения (RMSD)),

среднеквадратичных флуктуаций (**RMSF**) и радиуса инерции ( **$R_g$** ), а также путем визуализации траекторий (PyMol [8]).

Второй раздел посвящен определению *оптимальных размеров ячейки моделирования* при изучении кристаллизационных растворов белков методом МД. Выбор размера ячейки критичен, поскольку слишком маленькая ячейка может привести к искажению результатов из-за искусственных взаимодействий модели белка с ее периодическими копиями вследствие использования периодических граничных условий, а слишком большая – к неоправданному увеличению времени расчетов.

Для установления минимально допустимого размера ячейки был проведен сравнительный анализ данных МУРР и результатов МД. Согласно результатам МУРР [2–4], в кристаллизационном растворе лизоцима образуются димеры, но отсутствуют гексамеры. МД-моделирование данных олигомеров в ячейках разного размера показало, что димеры остаются стабильнее гексамеров независимо от объема ячейки, что согласуется с экспериментальными результатами [2–4]. Это позволило заключить, что для корректных расчетов достаточно использовать ячейку, при которой минимальное расстояние от ее грани до белка соответствует радиусу учета основных (невалентных) межмолекулярных взаимодействий (в данной работе он составил 1 нм). Ячейки меньшего размера не исследовались, так как их использование заведомо привело бы к артефактным взаимодействиям олигомера лизоцима с его периодическими копиями.

Таким образом, показано, что установленный размер ячейки является достаточным для корректного моделирования и может быть использован для повышения скорости вычислений [A2]. Адекватность результатов оценки стабильности белковых олигомеров с помощью МД дополнительно подтверждается слабой зависимостью динамики димера лизоцима от размеров ячейки по сравнению с доминирующим влиянием концентрации осадителя [A7].

В третьем разделе проведена *оценка применимости крупнозернистого силового поля MARTINI [9]* для исследования стабильности белковых олигомеров в кристаллизационных растворах. Необходимость такой оценки обусловлена тем, что при крупнозернистом подходе несколько атомов объединяются в одно крупное «зерно», сокращая общее число частиц, что позволяет значительно ускорить расчеты, но потенциально снижает точность моделирования по сравнению с классической атомистической МД.

Для решения данной задачи было проведено моделирование двух структурно-различных типов октамеров лизоцима (А и В) с помощью «упрощенного» поля MARTINI [9] и атомистического поля Amber99sb-ildn [7]. Результаты показали, что октамер типа А сохраняет свою целостность, а октамер типа В диссоциирует независимо от выбранного уровня детализации (атомистического или крупнозернистого). Таким образом, установлено, что результаты моделирования в обоих силовых полях согласуются. Это подтверждает корректность использования поля MARTINI для изучения подобных систем и открывает перспективы для моделирования более длительных стадий белковой кристаллизации, недоступного для атомистической МД [А3].

В третьей главе развитый в работе МД-подход (с использованием оптимальных размеров ячейки) применялся для уточнения структуры и исследования температурной стабильности олигомеров, образующихся в *предкристаллизационной фазе раствора протеиназы К (ProtK)*.

Согласно экспериментальным данным МУРР перед кристаллизацией ProtK в ее растворе образуются димеры [10]. Однако анализ кристаллической структуры этого белка (пр. гр.  $P4_32_12$ ) позволяет выделить из нее шесть структурно-различных типов димеров, каждый из которых является кандидатом на роль кластера-прекурсора кристалла ProtK (рис. 1). Для выяснения типа димера, образующегося перед кристаллизацией ProtK, в первом разделе с помощью атомистического МД-моделирования были получены траектории

движения шести указанных димеров в кристаллизационных условиях. Комплексная оценка структурно-динамических характеристик (RMSD, RMSF,  $R_g$ ) показала, что димер E является наиболее стабильным. Таким образом, уточнена структура димера, образующегося в кристаллизационном растворе ProtK [A6].

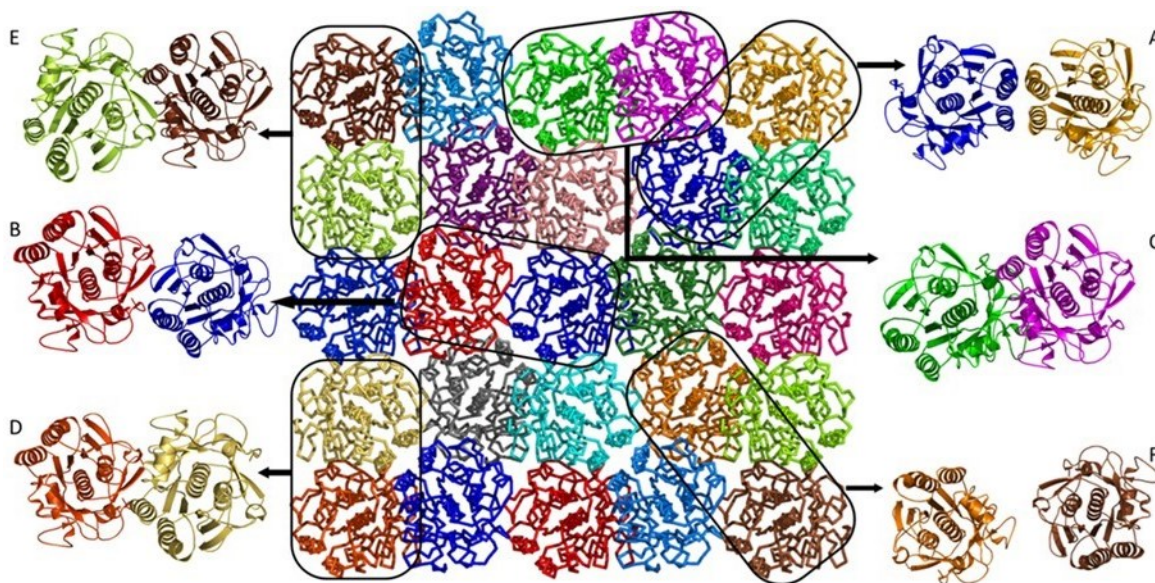


Рис. 1. Фрагмент тетрагональной кристаллической структуры протеиназы К (в центре) и выделенные из нее возможные типы кластеров-прекурсоров (димеры А–F).

В рамках второго раздела была подробно исследована *стабильность установленного кластера-прекурсора кристалла ProtK (димера E) в широких температурных пределах 20–80°C* путем проведения множественных (всего 57) независимых МД-симуляций.

Протеиназа К является термофильным белком, сохраняющим каталитическую активность в водных растворах до 70–80°C, с максимумом при 56°C [11]. Такие термофильные ферменты служат ценными промышленными биокатализаторами и широко применяются в биотехнологии. Однако для определения функционально значимой конформации ProtK необходимо получение ее кристаллов в условиях, максимально приближенных к нативным — при повышенных температурах. Поскольку кластеры-прекурсоры играют ключевую роль на ранних стадиях роста кристаллов, то исследование их

температурной стабильности критически важно для оценки возможности высокотемпературной кристаллизации ProtK.

Основанный на МД-результатах анализ структурно-динамических характеристик (RMSD, RMSF,  $R_g$ ) димера E показал немонотонную зависимость его стабильности от температуры (рис. 2). Несмотря на общий тренд к дестабилизации кластера-прекурсора при нагревании, обнаружены зоны повышенной устойчивости при температурах 20–60°C, 65°C и 80°C.

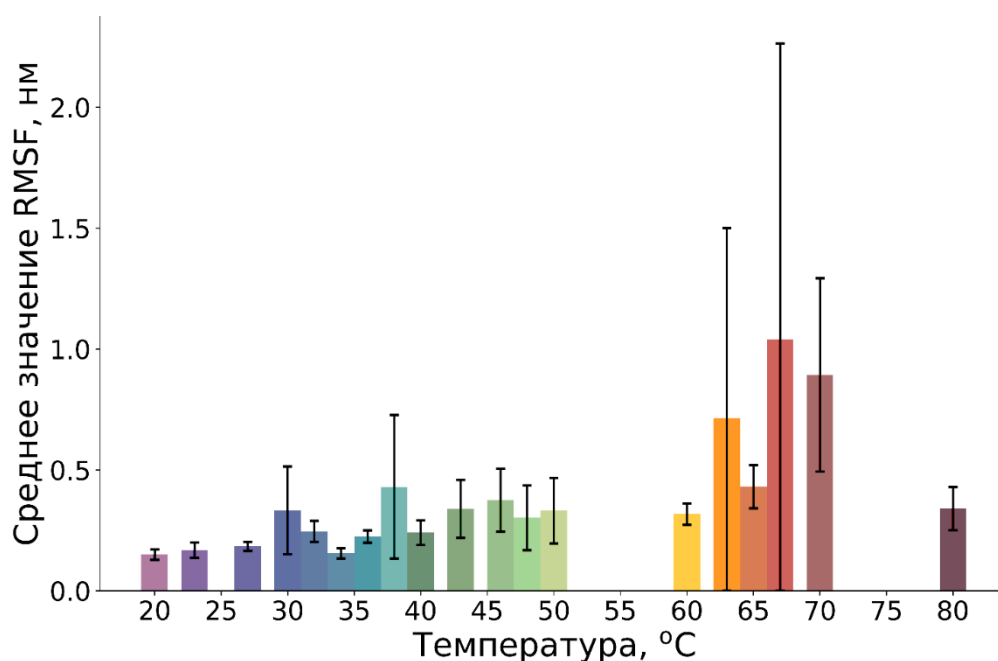


Рис. 2. Значения RMSF, усредненные по всем атомам  $C_\alpha$  кластера-прекурсора кристалла ProtK, смоделированного в кристаллизационном растворе при различных температурах (от 20 до 80°C). Указанные погрешности (на основании несмещенной оценки дисперсии) составляют одно стандартное отклонение при усреднении RMSF по трем независимым моделированиям для каждой температуры.

Анализ площади межмолекулярных контактов (рассчитанной как разность между доступными для растворителя суммарной площадью поверхности двух мономеров и площадью поверхности целого димера) показал, что полная диссоциация димера на мономеры происходит крайне редко – лишь в 4 из 57 моделирований (~7%), при температурах 38, 63, 67 и 70°C (рис. 3).

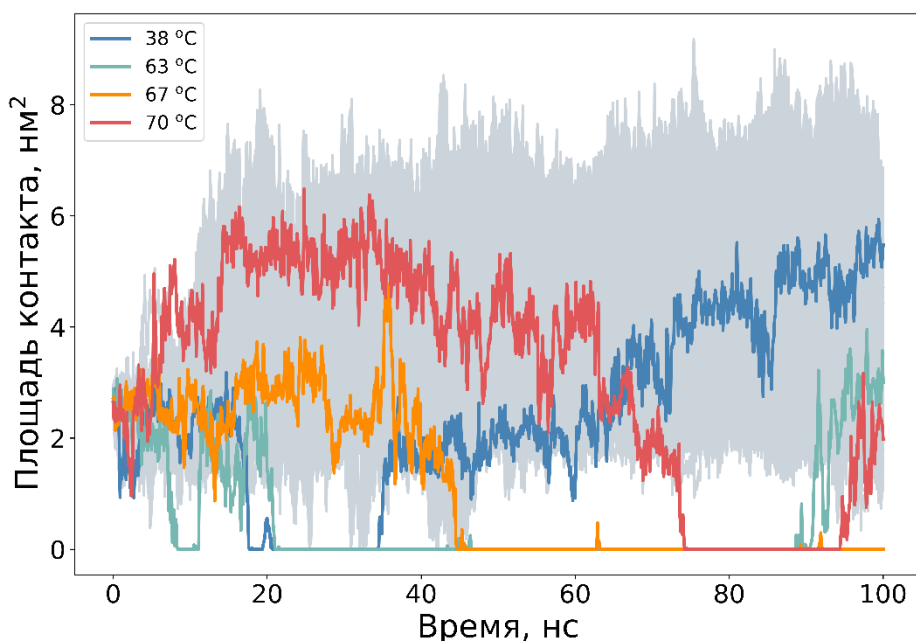


Рис. 3. Эволюция площади межмолекулярного контакта в кластере-прекурсоре кристалла ProtK (димере E) при температурах от 20 до 80°C. Цветные кривые соответствуют траекториям с длительной диссоциацией (при 38, 63, 67 и 70°C). Серой областью обозначен диапазон значений площади в остальных ~93 % симуляций, при которых димер оставался преимущественно стабильным.

Обнаруженная в работе значительная стабильность кластера-прекурсора кристалла ProtK в диапазоне температур 20–60°C позволила выдвинуть обоснованную гипотезу о перспективности проведения ее кристаллизации при нетипично высоких для большинства белков температурах (50–60°C) [A5]. Данное теоретическое предположение подтвердилось экспериментально: кристаллы ProtK были успешно получены методом диффузии паров после инкубации растворов белка при температуре 60°C (рис. 4).

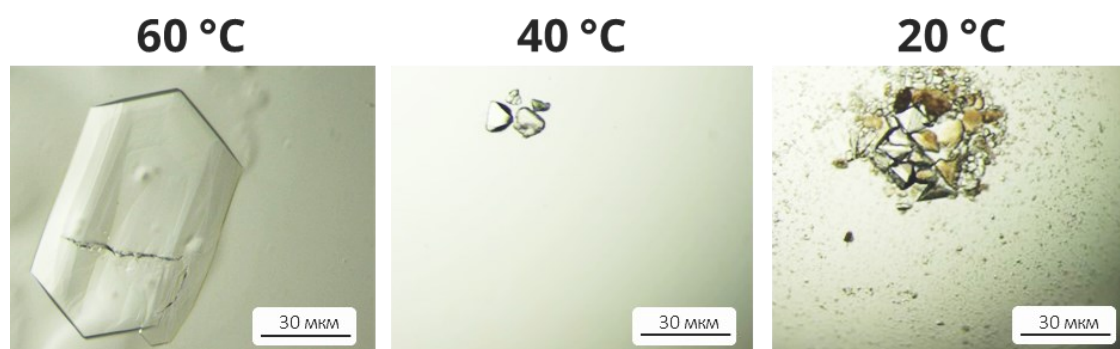


Рис. 4. Сравнение кристаллов ProtK, полученных после инкубации при 60°C, а также при 40 и 20°C. Остальные условия кристаллизации одинаковы: 20 мг/мл ProtK, 0.4 М Tris-буфер (pH 8), 1 М Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Кристаллы, выращенные при 60°C, не только крупнее, но и менее склонны к множественному росту.

Экспериментальные результаты подтверждают как адекватность использованного МД-подхода для оценки стабильности предкристаллизационных прекурсоров, так и его предсказательную способность в определении перспективных температурных диапазонов роста белковых кристаллов. Кроме того, они имеют практическое значение, поскольку получение структурных данных о каталитически значимых конформациях термофильных белков открывает новые возможности для более точной интерпретации механизмов их функционирования.

В **четвертой** главе с помощью предложенного в работе МД-подхода (включая использование оптимальных параметров моделирования) было проведено аналогичное исследование *предкристаллизационной фазы раствора* другого термофильного фермента – *термолизина*. Он проявляет максимальную каталитическую активность при температуре ~70°C [12], что делает его перспективным объектом для подтверждения и расширения применимости разработанного подхода, а также выявления общих и специфических закономерностей поведения кластеров-прекурсоров термофильных белков.

В первом разделе исходя из экспериментальных данных МУРР [13], согласно которым кластером-прекурсором кристалла термолизина является

гексамер, из кристаллической структуры белка (PDB ID: 3DNZ, пр. гр. P6<sub>1</sub>22) были выделены четыре структурно-различных типа гексамеров (A–D на рис. 5), являющихся потенциальными строительными блоками кристалла термолизина. Для *определения формы гексамера, являющегося кластером-прекурсором*, была смоделирована МД гексамера каждого типа в кристаллизационных условиях (при 20°C). Сравнительный анализ результатов с помощью структурно-динамических характеристик (RMSD, RMSF,  $R_g$ ) однозначно определил, что гексамер типа А является наиболее стабильным. Таким образом, была уточнена структура гексамера, образующегося в кристаллизационном растворе термолизина [A4].

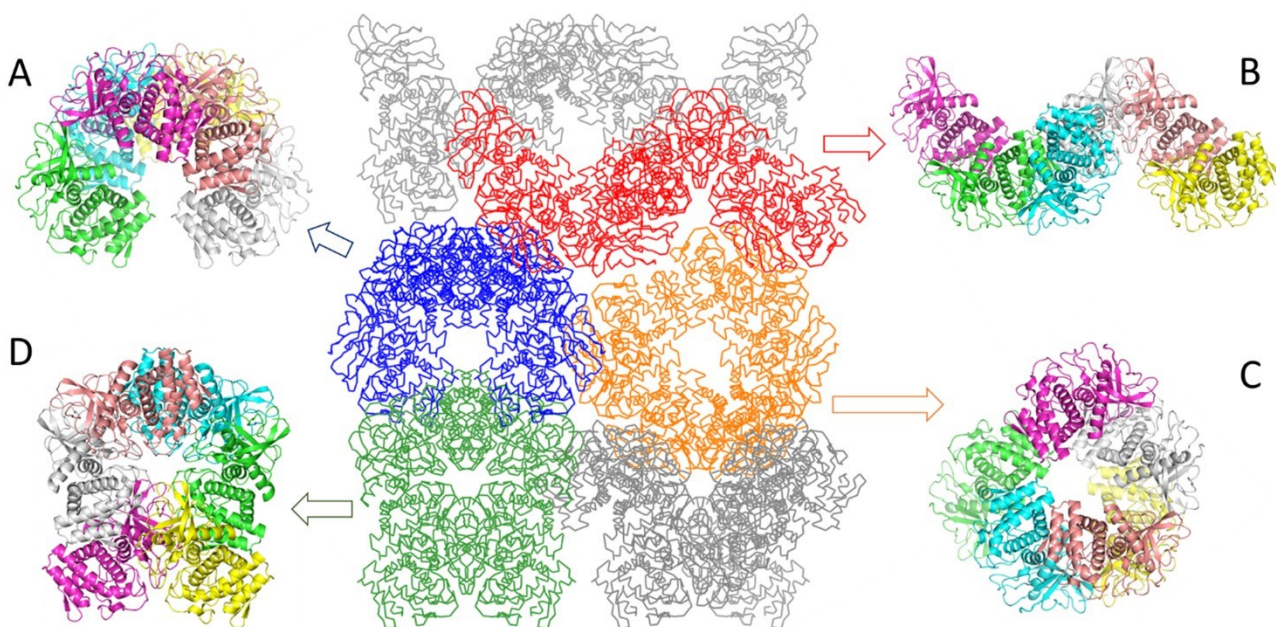


Рис. 5. Фрагмент гексагонального кристалла термолизина (в центре) и выделенные из него потенциальные кластеры-прекурсоры (гексамеры A–D).

Во втором разделе методом МД была проанализирована зависимость *стабильности установленного кластера-прекурсора кристалла термолизина* (гексамера А) от температуры.

Согласно критерию RMSF, в результате МД-моделирования прекурсор продемонстрировал высокую общую стабильность во всем исследованном температурном диапазоне (от 10 до 90°C, рис. 6).

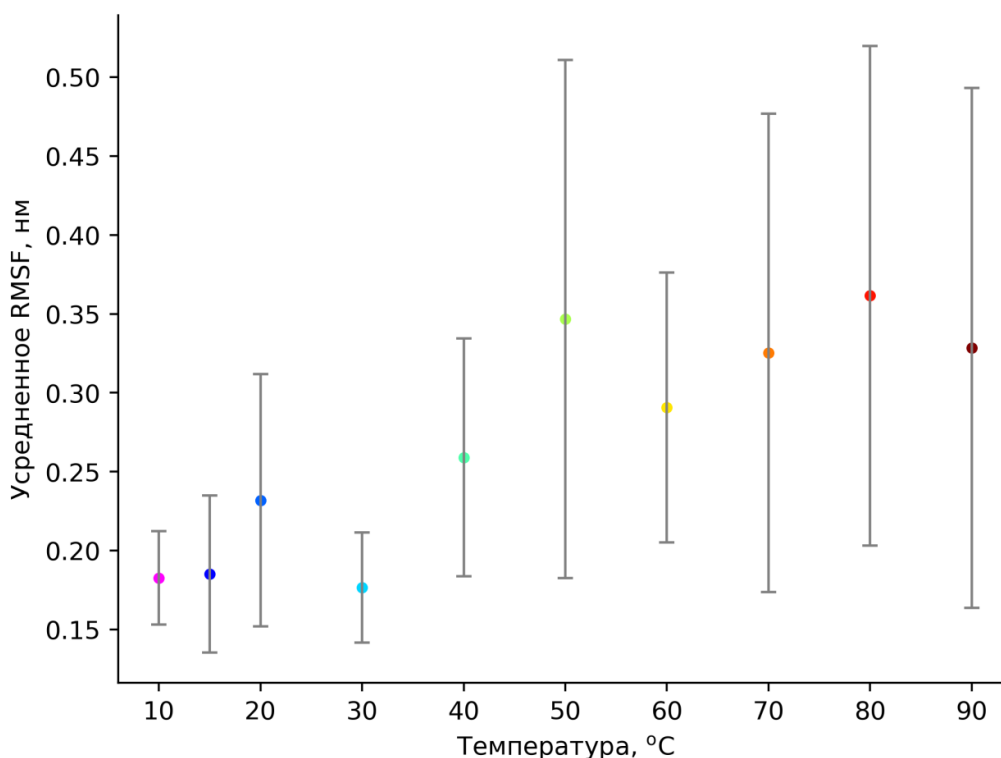


Рис. 6. Значения RMSF, усредненные сначала по  $C_{\alpha}$ -атомам кластера-прекурсора кристалла термолизина, а затем по независимым траекториям для каждой температуры (от 10 до 90°C). Указанные погрешности составляют одно стандартное отклонение при усреднении RMSF по независимым моделированиям.

Термостабильность прекурсора подтверждается результатами анализа площади всех межмолекулярных контактов, указывающим на высокую структурную целостность гексамера: полная диссоциация на олигомеры меньшего порядка не наблюдалась ни в одном из 38 независимых моделирований во всем температурном диапазоне. Кратковременная потеря контакта между несколькими молекулами в составе гексамера обнаружена лишь в одном моделировании (при 50°C, рис. 7).

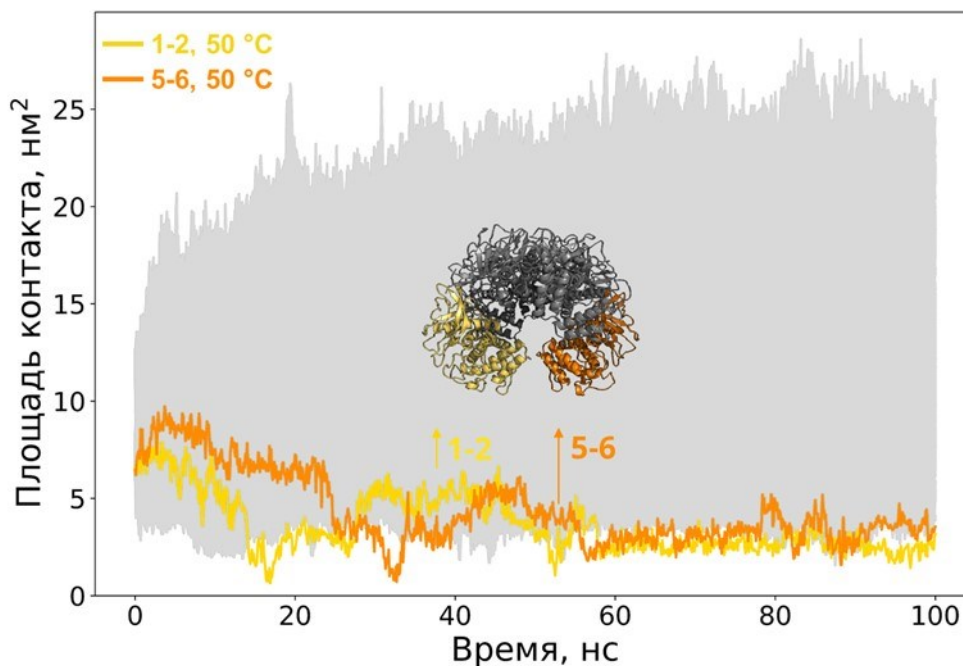


Рис. 7. Эволюция площади межмолекулярных контактов в кластере-прекурсоре кристалла термолизина (гексамере А) при температурах от 10 до 90°C. Цветные кривые соответствуют единственной траектории с кратковременной диссоциацией (при 50°C). Серой областью обозначен диапазон значений площадей в остальных 37 симуляциях, при которых димер оставался преимущественно стабильным.

Таким образом, высокая стабильность кластера-прекурсора кристалла термолизина в диапазоне 10–90°C указывает на возможность его кристаллизации при повышенных температурах. Результаты МД-моделирования служат теоретическим обоснованием для проведения высокотемпературных (вплоть до 90°C) кристаллизационных экспериментов, которые позволили бы получить структурные данные о функционально значимой конформации термолизина [A1].

## Выводы и основные результаты работы:

1. Предложен и апробирован подход к исследованию кристаллизационных растворов белков, основанный на сочетании «упрощенной» крупнозернистой и традиционной атомистической МД, позволяющий эффективно изучать различные этапы белковой кристаллизации за счет оптимального выбора силового поля (уровня детализации модели).
2. МД-моделирование двух типов октамеров (А и В) лизоцима с использованием атомистического (Amber99sb-ildn) и крупнозернистого (MARTINI) силовых полей показало, что октамер А стабильнее октамера В независимо от выбора поля. Согласованность полученных результатов **подтверждает корректность применения поля MARTINI** для исследования кристаллизационных растворов глобулярных белков.
3. Установлено, что увеличение объема ячейки при моделировании МД олигомеров белков в кристаллизационных растворах не приводит к существенным изменениям в их поведении. **Определены размеры ячейки моделирования, достаточные** для исследования кристаллизационных растворов белков с помощью МД – при расстоянии между атомами белка и гранью ячейки, составляющем 1 радиус отсечки невалентных взаимодействий (1 нм).
4. Сравнительный анализ динамики шести возможных типов димеров протеиназы К в кристаллизационном растворе выявил, что максимальную стабильность проявляет димер Е. Это позволяет **идентифицировать димер Е** как наиболее вероятную **единицу роста (кластер-прекурсор) кристалла протеиназы К**.
5. Обнаружена высокая **стабильность димера Е** (кластера-прекурсора кристалла) протеиназы К в температурном диапазоне **20–60°C**. Выдвинута обоснованная **гипотеза о возможности кристаллизации** данного белка в указанном интервале температур.

6. Предсказанная на основе МД-результатов перспективность проведения кристаллизации протеиназы К при нетипично высоких для большинства белков температурах (50–60°C) **подтверждена экспериментально**: кристаллы протеиназы К были успешно получены после инкубации при температуре 60°C. Результаты указывают на **адекватность использованного МД-подхода** для оценки стабильности олигомеров и его **предсказательную способность** в определении перспективных температур белковой кристаллизации.
7. Сравнительный анализ динамики четырех возможных типов гексамеров термолизина в кристаллизационном растворе выявил, что максимальную стабильность проявляет гексамер А. Это позволяет **идентифицировать гексамер А** как наиболее вероятную **единицу роста (кластер-прекурсор) кристалла термолизина**.
8. Обнаружена высокая **стабильность гексамера А** (кластера-прекурсора кристалла) термолизина в температурном диапазоне **10–90°C**. Выдвинута обоснованная **гипотеза о возможности кристаллизации** данного белка при температуре 60°C.

## Список цитируемой литературы:

1. Denesyuk A.I., Denessiouk K., Johnson M.S., Uversky V.N. // *Int J Mol Sci.* 2024. V. 25. № 22. P. 11858. DOI: 10.3390/IJMS252211858/S1.
2. Kovalchuk M. V., Blagov A.E., Dyakova Y.A., et al. // *Cryst Growth Des.* 2016. V. 16. № 4. P. 1792–1797. DOI: 10.1021/acs.cgd.5b01662.
3. Марченкова М.А., Волков В.В., Благов А.Е. и др. // *Кристаллография.* 2016. V. 61. № 1. P. 10–15. DOI: 10.7868/s0023476116010148.
4. Boikova A.S., Dyakova Y.A., Ilina K.B., et al. // *Acta Crystallogr D Struct Biol.* 2017. V. 73. P. 591. DOI: 10.1107/S2059798317007422.
5. Кордонская Ю.В., Тимофеев В.И., Дьякова Ю.А. и др. // *Кристаллография.* 2018. V. 63. № 6. P. 902–905. DOI: 10.1134/s002347611806019x.
6. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., et al. // *SoftwareX.* 2015. V. 1. P. 19–25. DOI: 10.1016/J.SOFTX.2015.06.001.
7. Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., et al. // *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics.* 2010. V. 78. № 8. P. 1950–1958. DOI: 10.1002/prot.22711.
8. Schrödinger L. 2015. DOI: 10.1007/s13398-014-0173-7.2.
9. Souza P.C.T., Alessandri R., Barnoud J., et al. // *Nature Methods* 2021 18:4. 2021. V. 18. № 4. P. 382–388. DOI: 10.1038/s41592-021-01098-3.
10. Boikova A.S., D'yakova Y.A., Il'ina K.B., et al. // *Crystallography Reports.* 2018. V. 63. № 6. P. 865–870. DOI: 10.1134/S1063774518060068.
11. Xu C., Battig A., Schartel B., et al. // *Biomacromolecules.* 2022. V. 23. № 11. P. 4841–4850. DOI: 10.1021/ACS.BIOMAC.2C01008/SUPPL\_FILE/BM2C01008\_SI\_002.PDF.
12. van den Burg B., Eijnsink V. // *Handbook of Proteolytic Enzymes.* 2013. V. 1. P. 540–553. DOI: 10.1016/B978-0-12-382219-2.00111-3.
13. Kovalchuk M. V., Boikova A.S., Dyakova Y.A., et al. // *J Biomol Struct Dyn.* 2019. V. 37. № 12. P. 3058–3064. DOI: 10.1080/07391102.2018.1507839.

### **Основные публикации автора по теме диссертации:**

A1. **Ю.В. Кордонская**, В.И. Тимофеев, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Влияние температуры на стабильность кластера-прекурсора кристалла термолизина» // *Кристаллография*. 2024. Т. 69. № 4. С. 694.

A2. **Ю.В. Кордонская**, И.Ф. Гарипов, В.И. Тимофеев, М.А. Марченкова, Ю.А. Дьякова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Влияние размеров ячейки моделирования на стабильность димеров и гексамеров лизоцима в кристаллизационном растворе» // *Российские нанотехнологии*. 2024. Т. 19. № 3. С. 291.

A3. **Ю.В. Кордонская**, В.И. Тимофеев, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Проверка применимости крупнозернистого силового поля MARTINI для моделирования белковых олигомеров в кристаллизационном растворе» // *Кристаллография*. 2024. Т. 69. № 5. С. 885.

A4. **Yu.V. Kordonskaia**, V.I. Timofeev, Yu.A. Dyakova, M.A. Marchenkova, Yu.V. Pisarevsky, S.Y. Silvestrova, M.V. Kovalchuk. «Identification of the precursor cluster in thermolysin crystallization solution by molecular dynamics methods» // *Mendeleev Commun.* 2023. V. 33. I. 2. P. 225.

A5. **Yu.V. Kordonskaya**, V.I. Timofeev, Yu.A. Dyakova, M.A. Marchenkova, Yu.V. Pisarevsky, Silvestrova, S.Y., M.V. Kovalchuk. «Unusual Temperature Behavior of Stability of Proteinase K Dimer Formed in Crystallization Solution Defined by Molecular Dynamics» // *Crystals*. 2022. V. 12. I. 11. P. 1645.

A6. **Yu.V. Kordonskaya**, V.I. Timofeev, M.A. Marchenkova, P.V. Konarev «Identification of the Precursor Cluster in the Crystallization Solution of Proteinase K Protein by Molecular Dynamics Methods» // *Crystals*. 2022. V. 12. I. 4. P. 484.

A7. **Ю.В. Кордонская**, В.И. Тимофеев, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Влияние размера ячейки моделирования и концентрации ионов осадителя на поведение димера тетрагонального лизоцима» // *Кристаллография*. 2021. Т. 66. № 3. С. 478.