

На правах рукописи

Столярская Мария Ярославовна

**БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ α -, β - и γ -
КАРБОАНГИДРАЗ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ
МИШЕНЕЙ**

1.5.3. – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Пушино — 2026

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном
учреждение науки Институт белка Российской академии наук**

**Научный
руководитель:**

кандидат биологических наук,
Никонов Олег Станиславович

**Официальные
оппоненты:**

Безсуднова Екатерина Юрьевна, доктор химических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории инженерной
энзимологии Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные
основы биотехнологии" Российской академии наук»,
(г. Москва)

Абдуллатыпов Азат Вадимович, кандидат биологических
наук, научный сотрудник лаборатории фотосинтетического
электронного транспорта Института фундаментальных
проблем биологии Российской академии наук, обособленного
структурного подразделения Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Федерального
исследовательского центра «Пушкинский научный центр
биологических исследований Российской академии наук», (г.
Пушино).

**Ведущая
организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта
Российской академии наук.

Защита диссертации состоится «__» ноября 2026 г. в ____ ч 00 мин на заседании
Диссертационного совета 24.1.232.01 на базе Федерального государственного
бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии
наук» по адресу: 142290, Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального
государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный
исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук» по адресу: 142290 г. Пушкино, ул.
Институтская, д. 3 и на сайте <https://www.pbcras.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета 24.1.232.01,
доктор биологических наук

Дегтярева Ольга
Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Карбоангидразы (CA, EC 4.2.1.1) - семейство металлоферментов, катализирующих обратимую реакцию гидратации диоксида углерода с образованием бикарбонат-иона и протона. Эта реакция играет важную роль в функционировании бикарбонатной буферной системы у человека и животных, поддержании кислотно-щелочного равновесия и регуляции внутриклеточного pH. Карбоангидразы участвуют в широком спектре физиологических процессов во всех доменах жизни.

На сегодняшний день идентифицировано восемь эволюционно независимых классов карбоангидраз (α , β , γ , δ , ζ , η , θ и ι). Наибольший интерес в качестве потенциальных терапевтических мишеней в настоящее время представляют α -CA человека, β - и γ -CA бактерий.

Нарушение активности отдельных изоформ α -CA человека связано с развитием ряда заболеваний, включая глаукому, эпилепсию, ожирение и опухолевые процессы. В то же время, β - и γ -CA патогенных микроорганизмов участвуют в адаптации к условиям организма хозяина, что делает их перспективными мишенями для антибактериальных препаратов. Ингибиторы карбоангидраз уже применяются в клинической практике и продолжают активно исследоваться как потенциальные противоопухолевые и антимикробные соединения.

Степень разработанности темы.

Несмотря на большое количество структурных и биохимических исследований для разных классов карбоангидраз сохраняются нерешённые вопросы, препятствующие пониманию структурных особенностей их функционирования, определяющих прикладной потенциал ферментов и возможности рационального дизайна ингибиторов.

Так, для α -CA основной проблемой остаётся недостаточное понимание молекулярных основ селективности ингибиторов к отдельным изоформам. Это связано с тем, что у человека α -класс представлен 15 изоформами, обладающими высокой степенью гомологии аминокислотных последовательностей и сходной архитектурой активного

центра, что существенно затрудняет разработку соединений, способных селективно взаимодействовать с отдельными изоформами фермента.

Наиболее показательным случаем данной проблемы являются комплексы α -CA II человека (α -hCA II) с ингибиторами 8V8 и 8V5 (PDB: 5NEA и 5NEE), для которых были показаны сверхвысокие значения констант ингибирования (Ferraroni M. et al., 2017). Несмотря на наличие экспериментальных структур комплексов, молекулярные механизмы, определяющие столь высокое сродство и селективность данных ингибиторов, остаются неизвестными. Это связано как с особенностями самих кристаллических структур, так и с неполнотой анализа белок-лигандных взаимодействий в опубликованных работах. В частности, для комплекса с ингибитором 8V5 отсутствует интерпретируемая электронная плотность для морфолинового фрагмента лиганда, тогда как для 8V8 описаны преимущественно консервативные взаимодействия, характерные для многих ингибиторов CA, не обладающих сопоставимым уровнем сродства к ферменту.

Одной из центральных проблем β -CA патогенных бактерий остаётся так называемый pH-парадокс — несогласованность между высокой каталитической активностью ферментов *in vitro* при щелочных значениях pH и предполагаемыми условиями их функционирования *in vivo*. Около двадцати лет назад для объяснения данного противоречия для β -CA mtCA2 *M. tuberculosis* была предложена модель pH-зависимой активации, связывающая появление активности с конформационными изменениями активного центра и олигомерной организацией фермента. Впоследствии эта модель была без прямой проверки распространена на β -CA иных организмов и утвердилась в литературе как общепринятая, хотя что структуры открытого и закрытого состояний mtCA2 получены при pH 7,0–7,5, где активность отсутствует, что противоречит предложенной модели, а связь между конформацией активного центра и олигомерной формой фермента остаётся неясной.

В свою очередь для γ -CA бактерий остаётся неясным, почему белки с одинаковым каталитическим доменом могут существенно различаться по каталитической активности. Долгое время единственной

предполагаемой γ -СА *E. coli* считался белок YrdA, не проявляющий каталитической активности. Однако позже была описана высокоактивная γ -СА EcoSA γ с идентичным каталитическим доменом (Park et al., 2012; Del Prete et al., 2020), отличающаяся от неактивного белка YrdA дополнительным N-концевым доменом длиной 72 а.о. Это позволяет предположить его возможное участие в формировании функциональной структуры фермента. При этом до настоящего времени штаммовая принадлежность EcoSA γ и функциональное назначение N-концевого домена оставались неустановленными.

Таким образом, несмотря на признанный терапевтический потенциал СА, для каждого из трёх классов остаются нерешённые вопросы, не позволяющие обоснованно оценивать их как терапевтические мишени. В связи с этим актуальным становится исследование структурных механизмов функционирования α -, β - и γ -классов СА, необходимое для их практического использования в дизайне лекарственных средств.

Цели и задачи исследования

Целью работы является определение особенностей структурных механизмов функционирования карбоангидраз α -, β - и γ -классов.

Основные задачи работы:

1. Получить препарат белка α -СА II быка в качестве, пригодном для кристаллизации. Получить кристаллы комплексов α -СА II быка с ингибиторами 8V8 и 8V5.

2. Определить структуры комплексов α -СА II быка с ингибиторами 8V8 и 8V5. Установить причины их высокого сродства и селективности к α -СА II.

3. Исследовать стабильность открытой и закрытой конформаций β -СА при различных олигомерных состояниях.

4. Определить роль N-концевого домена γ -СА EcoSA γ в формировании каталитически активной формы фермента.

Научная новизна. Впервые установлено, что решающий вклад в селективность ингибиторов нового поколения 8V8 и 8V5 к α -СА II вносит не только взаимодействие хвостовой части лиганда с остатками активного

центра, как предполагалось ранее для ингибиторов данного класса, но и стерическая комплементарность молекулы ингибитора и полости активного центра по принципу «ключ–замок». Это уточняет принципы дизайна селективных ингибиторов α -CA, ранее опиравшиеся преимущественно на подбор функциональных групп без учёта геометрии активного центра в целом. Расчётным путём впервые проверена гипотеза о зависимости конформации активного центра β -CA mtCA2 от олигомерной формы фермента, применявшаяся в литературе около 20 лет без прямого подтверждения. Показано, что открытая и закрытая конформации активного центра сохраняются устойчивыми как в димере, так и в тетрамере. Существование устойчивой закрытой конформации, не предполагающей координации с металлом, открывает возможность создания ингибиторов принципиально иного типа, действие которых, в отличие от ингибиторов α -CA, не основано на связывании с каталитическим ионом металла. Для EсoCA γ впервые теоретически обоснована якорная функция N-концевого домена, формирующего гидрофобный α -спиральный участок и обеспечивающего ассоциацию фермента с мембраной, — вопреки ранее принятому представлению о EсoCA γ как о цитоплазматическом белке. Установлено также, что каталитически активный полноразмерный белок EсoCA γ характерен для патогенных и условно-патогенных представителей семейства Enterobacteriaceae, тогда как укороченный неактивный гомолог YrdA — для лабораторных штаммов *E. coli*. Это расширяет представления о структурной организации и физиологической роли γ -CA бактерий.

Научно-практическое значение. Установленные механизмы селективного связывания ингибиторов 8V8 и 8V5 позволяют оптимизировать принципы дизайна новых соединений ингибирующих α -hCA. Устойчивость обеих конформаций активного центра β -CA mtCA2 независимо от олигомерной формы фермента позволяет использовать в разработке ингибиторов и димер, и тетрамер, а закрытую конформацию как альтернативный сайт связывания, не координированный с металлом. Связь полноразмерной EсoCA γ с патогенными Enterobacteriaceae повышает её значимость как антибактериальной мишени, а

предполагаемая мембранная ассоциация фермента важна при разработке соединений. Основные научные положения, выводы и рекомендации диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры нормальной физиологии с биофизикой ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации при изучении дисциплин «Нормальная физиология человека» и «Основы анатомии и физиологии человека» (акт о внедрении ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России).

Методология и методы исследования. Выбор объектов исследования определялся задачами, которые предстояло решить для каждого класса СА. Для изучения селективности ингибиторов 8V8 и 8V5 объектом выбрана рекомбинантная α -СА II быка (α -bCA II) — гомолог α -hCA II (идентичность ~80%). Сопоставление структур комплексов с данными 2017 года позволило выявить контакты, специфичные для α -СА II, и сформулировать принципы селективности ингибиторов к целевой изоформе. Стабильность конформаций активного центра при разных олигомерных состояниях изучали на β -СА mtCA2, для которой предложена гипотеза рН-зависимой активации активного центра. Гипотезу о мембранной ассоциации проверяли на модели γ -СА EsoCA γ . Для решения задач по α -СА использовали методы молекулярной биологии, а для β - и γ -СА использовались биоинформатические методы, включая предсказательные алгоритмы и МД-симуляции.

Личный вклад автора. Основные результаты работы получены автором лично. Автор принимал непосредственное участие на всех этапах исследования, включая постановку задач, получение препарата белка bCA в препаративных количествах, его очистку, а также подбор условий кристаллизации, со-кристаллизацию препарата белка с лигандами, решение и уточнение пространственных структур комплексов, анализ кристаллических структур комплексов, проведение биоинформатического анализа, выполнение молекулярно-динамических расчётов, интерпретацию полученных результатов и подготовку научных публикаций.

Органические соединения 8V5 и 8V8 были предоставлены Станиславом Калининым (Институт химии СПбГУ) и Антоном Шетневым (ЦТФТ им. Дорогова, г. Ярославль). Сбор дифракционных данных проводился Габдулхаковым Азатом Габдрахмановичем (Институт белка РАН, Пущино). Отдельные этапы работы, связанные с проведением и анализом молекулярно-динамических симуляций комплексов α -CA, были выполнены совместно с Борисевич Софией Станиславовной (Уфимский институт химии РАН).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Высокое сродство ингибитора 8V8 к α -CA II определяется формированием выраженного гидрофобного потенциала между лигандом и кластером неполярных остатков активного центра, а селективность — стерическим соответствием лиганда связывающему карману.

2. Высокое сродство ингибитора 8V5 к α -CA II обусловлено сочетанием гидрофобных, водородных и π -взаимодействий. Селективность ингибитора определяется взаимодействием морфолинового фрагмента с остатком Phe131.

3. Конформации активного центра β -CA mtCA2 сохраняют стабильность независимо от олигомерного состояния фермента.

4. N-концевой домен γ -CA EsoCA γ формирует гидрофобный α -спиральный домен, который может участвовать в ассоциации фермента с мембранной.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов исследования подтверждается использованием современных биоинформатических, молекулярно-биологических и структурно-биологических методов, а также применением специализированных программ для анализа последовательностей, молекулярного моделирования и обработки рентгеноструктурных данных. Экспериментальные исследования проводили с использованием сертифицированного лабораторного оборудования.

Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: 26-й Пущинской школе-конференции молодых учёных с

международным участием «Биология — наука XXI века» (Пушино, 2023), 62-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2024 (Новосибирск, 2024), 6-й Российской конференции по медицинской химии (Нижний Новгород, 2024).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи, индексируемые в базах данных Scopus и Web of Science, а также 3 тезиса докладов.

Структура диссертации: Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работу иллюстрируют _____ рисунков и _____ таблиц. Общий объем диссертации _____ страниц. Библиография включает _____ названий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение, очистка и кристаллизация α -bCA II

Рекомбинантную α -bCA II нарабатывали в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3)pLacRARE, трансформированных плазмидой pET11c, содержащей полноразмерный ген α -bCA II под контролем T7-промотора. Трансформацию проводили методом теплового шока с последующим отбором на селективной среде LB с ампициллином.

Экспрессию гена белка индуцировали добавлением ИПТГ до конечной концентрации 0,5 mM при достижении оптической плотности $OD_{600} \approx 0,6$, в присутствии $ZnSO_4$ (0,5 mM). После индукции клетки выращивали при 18 °C в течение 16 часов.

Выделение белка проводили после разрушения клеток на ультразвуковом гомогенизаторе EmulsiFlex-C3. Очистку α -bCA II осуществляли последовательным применением гидрофобной (Butyl-Sepharose) и эксклюзионной (Superdex G75 16/60) хроматографии. Чистоту препарата контролировали электрофорезом в ПААГ в присутствии ДСН. Кристаллы комплексов α -bCA II с ингибиторами 8V5 и 8V8 получали методом диффузии паров «висячая капля».

Сбор дифракционных данных и определение структур комплексов

Дифракционные данные собирали при температуре 100 К на лабораторной рентгеновской установке Rigaku XtaLAB Synergy-S с использованием криогенной системы Oxford Cryostream. Структуры комплексов определяли методом молекулярного замещения с использованием программы MolRep. В качестве поисковой модели использовали структуру α -bCA II (PDB ID: 1V9E). Уточнение моделей проводили в программах REFMAC5 (версия 8.0.015) и Phenix (версия 1.21.2.5419) с последующей ручной корректировкой в Coot (версия 0.9.8.92). Карты электронной плотности были рассчитаны с использованием phenix.polder и визуализированы в PyMOL.

Биоинформатический анализ

Поиск гомологичных последовательностей выполняли с использованием BLAST+ по базам данных NCBI и UniProtKB. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей проводили с помощью T-Coffee и Clustal Omega. Визуализацию выравниваний выполняли в ESPript 3.0. Для анализа геномного окружения γ -CA EcoCA γ использовали базы данных EcoCyc, BioCyc и ShiBase. Анализ включал поиск соответствующего гена и возможной оперонной организации.

Моделирование пространственной структуры γ -CA EcoCA γ

Пространственную структуру белка EcoCA γ моделировали с использованием AlphaFold Multimer. В качестве объекта использовали аминокислотную последовательность *Shigella dysenteriae* 1 strain 197 (UniProt идентификатор: Q32B70). Данный белок был выбран в качестве объекта моделирования, поскольку его последовательность на 100 % идентична последовательности γ -CA из *E. coli* (EcoCA γ ; accession: WP_009008373.1), при этом для него доступна полная аннотированная запись в базах данных, чего не наблюдалось для EcoCA γ (WP_009008373.1).

Моделирование выполняли для тримерной формы белка, поскольку функционально активной формой γ -CA является гомотример, а активный центр располагается на границе мономеров. В активные центры модели вручную вводили ионы Zn^{2+} с использованием программ COOT и PHENIX

на основании известных кристаллических структур γ -CA (PDB ID: 3TIS и 3TIO). Предсказание мембранной ассоциации и пространственной ориентации EсоCA γ относительно липидного бислоя выполняли с использованием алгоритмов TOPCONS, OCTOPUS, SCAMPI, SPOSTOPUS, PolyPhobius, Philius и PPM 3.0. Визуализацию структур и комплексов проводили в программе PyMOL.

Молекулярно-динамическое моделирование

Молекулярно-динамические симуляции комплексов α -bCA II с ингибиторами выполняли в пакете Desmond с использованием силового поля OPLS4. В качестве стартовых моделей использовались определенные мной методом рентгеноструктурного анализа структуры α -bCA II с лигандами 8V5 и 8V8. Расчеты проводили с использованием кубической расчётной ячейки, заполненной водой TIP3P с добавлением NaCl до концентрации 0,15 М. После минимизации энергии белка проводили уравнивание систем в ансамблях NVT и NPT до температуры 310 К и давления 1 bar. Длительность рассчитанных МД траекторий составляла 300 нс для каждого объекта.

Молекулярно-динамические симуляции β -CA mtCA2 и модели EсоCA γ проводили в пакете GROMACS 2023.2. Для анализа связи между олигомерным состоянием фермента и конформацией активного центра были собраны четыре модельные системы: димер и тетрамер mtCA2 в открытом и закрытом состояниях активного центра. В качестве исходных использовали экспериментально определенные структуры: PDB ID 1YM3 и PDB ID 2A5V. Протонирование остатков задавали для pH 8,4, соответствующего условиям каталитической активности mtCA2. Протонные состояния ключевых остатков Asp53 и Arg55 дополнительно проверяли расчётом pKa. Продолжительность каждой симуляции составляла 300 нс, каждую систему рассчитывали в трёх независимых повторях, что дало суммарно 3,6 мкс расчётного времени. Для EсоCA γ были собраны две модельные системы: водная и мембранная. Мембранную систему собирали с использованием липидного бислоя состава PE:PG:CL = 75:20:5, отражающего состав внутреннего листка внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Уравнивание

систем проводили в ансамблях NVT и NPT с постепенным снятием позиционных ограничений. Качество уравнивания мембранной системы дополнительно контролировали по значениям площади на липид (APL) и толщины бислоя (P–P distance). Длительность молекулярно-динамических симуляций составляла 100 нс для мембранной системы и 50 нс для водной системы. Каждую систему рассчитывали в трёх независимых повторях.

Выбор силового поля определялся задачами исследования: OPLS4 применяли для анализа белок-лигандных комплексов, поскольку данное поле оптимизировано для параметризации малых органических молекул и обеспечивает точное описание контактов в сайте связывания. CHARMM36m использовали для моделирования β -CA mtCA2 и EcoCA γ . Для mtCA2 выбор был обусловлен корректным описанием подвижных петлевых участков, формирующих активный центр β -CA. Для EcoCA γ значение имели улучшенное описание конформационной гибкости белка, что актуально для исследования N-концевого домена EcoCA γ , и параметризация липидов, обеспечивающая корректное моделирование мембранной системы. Кроме того, применение единого силового поля для водной и мембранной систем EcoCA γ обеспечивало корректность их сравнения между собой.

Анализ молекулярно-динамических траекторий

Анализ траекторий включал расчёт RMSD, RMSF, радиуса гирации (R_g), площади поверхности, доступной растворителю (SASA), межатомных расстояний и межмолекулярных взаимодействий. Устойчивость активного центра mtCA2 оценивали по расстояниям в координационной сфере иона Zn^{2+} и по стабильности солевого мостика Asp53–Arg55. Олигомерную организацию фермента характеризовали отдельно через число межсубъединичных контактов, площадь экранированной поверхности и взаимную ориентацию субъединиц. Для тетрамера эти параметры рассчитывали отдельно, как для внутридимерного и димер-димерного интерфейсов. Для анализа использовали модули пакета GROMACS. Визуализацию структур и моделей проводили в PyMOL, а построение графиков с использованием библиотеки Matplotlib и MD-

DaVis. Для анализа взаимодействий «белок–лиганд» в комплексах α -CA II траектории молекулярной динамики анализировали в Schrödinger Desmond (версия 2022-4). Оценивали водородные связи, гидрофобные и ионные взаимодействия, а также контакты, опосредованные молекулами воды, между лигандом и остатками белка. Частоту формирования взаимодействий определяли по их присутствию в кадрах траектории. Анализ и визуализацию белок-лигандных взаимодействий выполняли с использованием модуля Simulation Interactions Diagram пакета Schrödinger Maestro (версия 2022-4).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Получение и со-кристаллизация α -bCA2 с лигандами 8V8 и 8V5

Препарат рекомбинантной α -bCA2 был наработан и очищен согласно протоколу, описанному в разделе «Материалы и методы». Кристаллы комплексов α -bCA2 с ингибиторами 8V8 и 8V5 получены в соотношении 1:1 (Рис. 1).

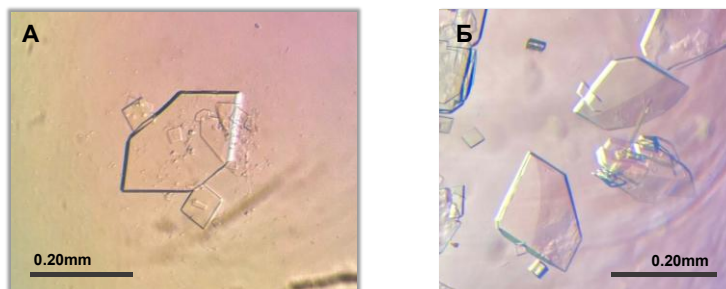


Рис. 1. Кристаллы α -bCA2 в комплексе с ингибиторами 8V8 (А) и 8V5 (Б).

Определение структур комплексов α -bCA2 с лигандами 8V8 и 8V5

Структуры комплексов α -bCA2 с ингибиторами 8V8 и 8V5 определены с разрешением 1,5 Å и 1,7 Å соответственно. Обе структуры депонированы в банк белковых структур (PDB ID: 23ON и 23OM). Статистика уточнения представлена в Таблице 1.

Таблица 1. Статистика сбора дифракционных данных и уточнения структур α -bCA2 в комплексе с лигандами 8V8 (PDB ID: 23ON) и 8V5 (PDB ID: 23OM).

PDB ID	23ON	23OM
Пределы разрешения (Å)	24.35–1.50 (1.55–1.50)	24.55–1.70 (1.76–1.70)
Пространственная группа	P 1 21 1	P 1 21 1
Параметры ячейки (Å, °)	59.77 × 80.16 × 61.77; 90, 106.94, 90	59.09 × 81.04 × 61.14; 90, 105.82, 90
Число уникальных отражений	89053 (8827)	59650 (5210)
полнота (%)	99.9 (99.9)	97.8 (86.4)
В-фактор Вильсона (Å ²)	8.28	11.50
Рефлексы, использованные при уточнении	89007 (8824)	59622 (5207)
Рефлексы, использованные для R _{free}	4,520 (447)	3,041 (274)
R-фактор _{work}	0.1557 (0.2264)	0.1890 (0.2575)
R-фактор _{free}	0.2001 (0.2701)	0.2503 (0.3118)
Предпочтительные области диаграммы Рамачандрана (%)	96.67	95.51
Допустимые области (%)	3.53	4.30
Недопустимые области (%)	0.00	0.00

Структурный анализ связывания ингибитора 8V8 с α -bCA II

В структуре α -bCA II•8V8 отчетливо наблюдалась электронная плотность для всей молекулы лиганда, что позволило детально описать его положение в активном центре фермента и контакты с окружающими аминокислотными остатками (Рис. 2). Атом азота сульфонамидной группы координирует ион цинка (2,0 Å) и образует две водородные связи с Thr199 (2,8 Å и 2,7 Å). Бензольное кольцо участвует в гидрофобных взаимодействиях с Leu198 (~4,2 Å и ~4,4 Å соответственно), метилоксазольный фрагмент с Phe131 (~4,4 Å), а хвостовая метильная группа ориентирована в сторону Pro202 (~4,4 Å).

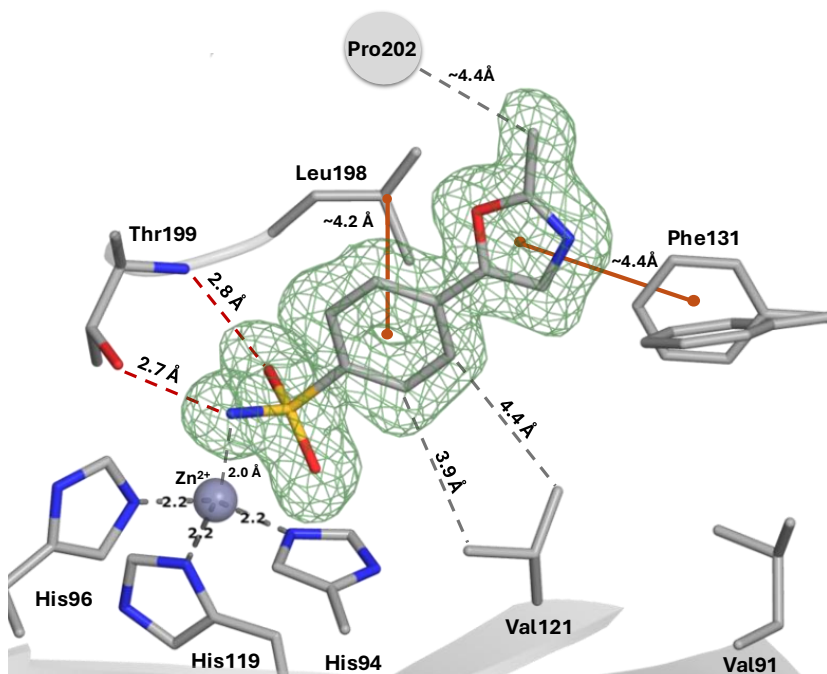


Рис. 2. Активный центр α -bCA II в комплексе с 8V8. Электронная плотность (polder mF_o-DF_c , 3σ) показана зеленой сеткой. Ключевые аминокислотные остатки активного центра показаны в стержневой модели. Ион цинка показан сферой.

При связывании лиганда в активном центре происходит десольватация и компактизация боковых групп аминокислотных остатков гидрофобного кластера. Так, высокое сродство 8V8 к α -СА II определяется, по всей видимости, преимущественно гидрофобными взаимодействиями между лигандом и остатками кармана — Leu198, Leu141, Val121, Val143, Trp209, Val91, Phe131, Ala133, Ala134 и Pro202. Оценка геометрического соответствия поверхности лиганда и внутренней поверхности активного центра выявила высокую степень стерической комплементарности, согласующейся с моделью «ключ–замок» (Рис. 3).

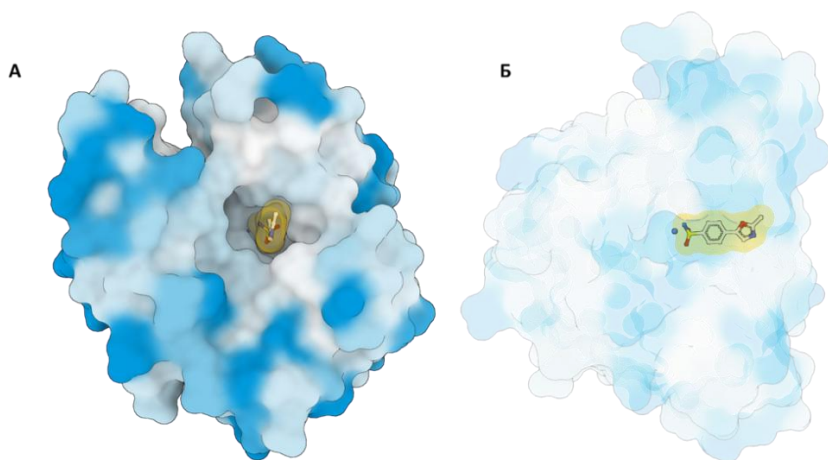


Рис. 3. (А): поверхность α -bCA II в комплексе с 8V8, окрашенная градиентом по гидрофобности, где синий – полярные остатки, белый – гидрофобные. (Б): срезка той же структуры в повороте на 90° .

Структурный анализ связывания ингибитора 8V5 с α -bCA2

В структуре α -bCA II•8V5 впервые получена непрерывная электронная плотность для всей молекулы лиганда, включая морфолиновый фрагмент. Это позволило уточнить особенности связывания лиганда в активном центре и описать ранее не установленные контакты. Атом азота сульфонамидной группы координирует ион цинка ($2,0 \text{ \AA}$) и образует две водородные связи с Thr199 ($2,8 \text{ \AA}$ и $2,7 \text{ \AA}$). Тиофеновое кольцо участвует в гидрофобных взаимодействиях с Leu198 ($\sim 4,2 \text{ \AA}$). Атом кислорода

боковой цепи Gln92 образует бифуркационную водородную связь с оксазольным кольцом и карбоксильной группой лиганда (3,2 Å и 2,8 Å), а морфолиновый фрагмент участвует в СН- π /диполь- π -взаимодействии с Phe131 (~4,0 Å) (Рис. 4).

Анализ аминокислотного окружения активных центров различных α -изоформ показал, что остаток Phe131 специфичен для α -CA II: у α -hCA IX и α -hCA XII в соответствующей позиции находятся валин и аланин соответственно. Утрата ароматического остатка в этой позиции сопровождается утратой стабилизирующего взаимодействия и ростом констант ингибирования до $K_i = 36,4$ нМ и 30,4 нМ против $K_i = 0,02$ нМ для α -hCA II — различие, составляющее около трёх порядков величины (Ferraroni M. et al., 2017).

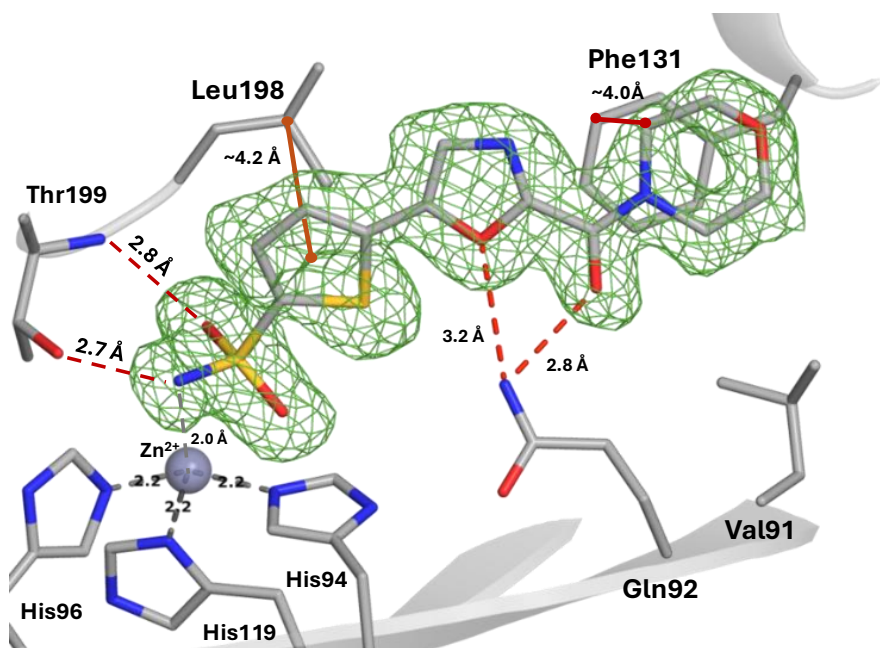


Рис. 4. Активный центр α -bCA II в комплексе с 8V5. Электронная плотность (polder $mF_o - DF_c$, 3σ) показана зеленой сеткой. Ключевые аминокислотные остатки активного центра показаны в стержневой модели. Ион цинка показан сферой.

Молекулярно-динамический анализ комплексов α -bCA2 с ингибиторами 8V8 и 8V5

С целью проверки того, что наблюдаемые в кристаллических структурах положения лигандов не являются артефактом условий кристаллизации или кристаллической упаковки, проведены молекулярно-динамические расчёты полученных комплексов α -bCA П•8V8 и α -bCA П•8V5 продолжительностью 300 нс каждый. Оба лиганда сохраняли исходное положение в активном центре на всём протяжении расчётов, что подтверждает кристаллографические позиции связывания. В комплексе с 8V8 преобладают гидрофобные взаимодействия с кластером активного центра (Рис. 5). Для комплекса с 8V5, помимо координационной связи Zn^{2+} и гидрофобных взаимодействий, зафиксированы водородная связь карбоксильной группы лиганда с Glu92 и $CH-\pi$ взаимодействие морфолинового фрагмента с Phe131. Таким образом, результаты молекулярно-динамических расчётов согласуются с данными структурного анализа.

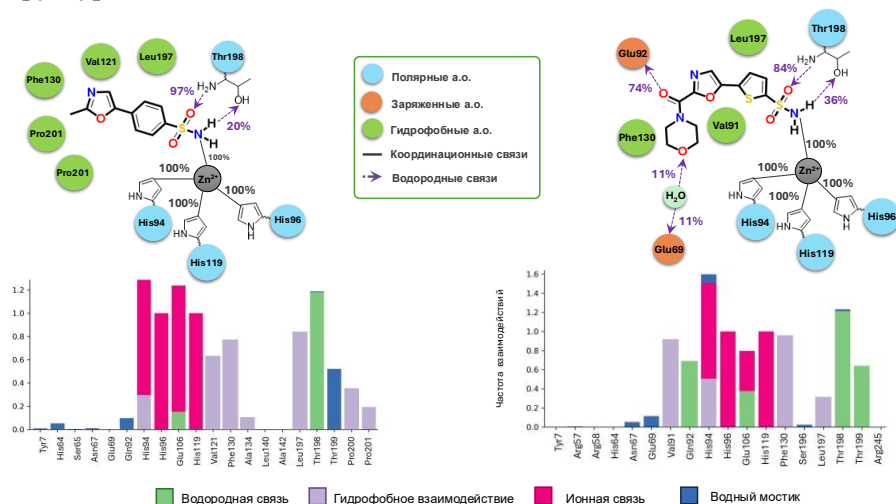


Рис. 5. Взаимодействия лиганд–белок по данным молекулярной динамики: **слева** — комплекс α -bCA2•8V8, **справа** — комплекс α -bCA2•8V5. **Вверху** — схемы ключевых контактов лиганда с остатками активного центра (показаны контакты, наблюдаемые более чем в 10% времени симуляции). **Внизу** — частота атомарных взаимодействий.

Исследование механизма pH-зависимой активации β -CA

Предложенная для β -CA модель pH-зависимой активации, связывающая конформационные изменения активного центра с переходом фермента между димерной и тетрамерной формами (Covarrubias et al., 2005; 2006), основана на кристаллических структурах mtCA2 *Mycobacterium tuberculosis* в закрытой (PDB ID: 1YM3) и открытой (PDB ID: 2A5V) конформациях активного центра (Рис. 6). В открытом состоянии Asp53 смещается из координационной сферы Zn^{2+} и образует солевой мостик с Arg55, освобождая координационную позицию для связывания молекулы воды или гидроксид-иона. Именно гидроксид-ион, координированный ионом Zn^{2+} , выступает нуклеофилом в реакции гидратации CO_2 и необходим для проявления каталитической активности фермента. В закрытом состоянии остаток Asp53 выступает четвёртым лигандом иона Zn^{2+} , тем самым блокируя доступ молекулы воды и субстрата к активному центру. Методом динамического светорассеяния показано, что при pH 8,4 преобладает тетрамерная форма фермента, тогда как при pH 7,5 — димерная (Covarrubias et al., 2006). Поскольку каталитическая активность mtCA2 наблюдается при pH 8,4, авторами сделан вывод о связи активации фермента с переходом из димерной в тетрамерную форму. Однако опубликованные данные содержат противоречия этой модели. Структура открытой конформации (PDB ID: 2A5V) получена при pH 7,5, при котором каталитическая активность mtCA2 не наблюдается. Кроме того, тетрамерная форма фермента присутствует в растворе уже при pH 7,5. Таким образом, связь между конформацией активного центра и олигомерным состоянием фермента остаётся неустановленной. Для проверки связи между конформацией активного центра и олигомерным состоянием фермента были проведены МД симуляции четырёх систем: димера и тетрамера mtCA2 в открытом и закрытом состояниях активного центра. В качестве исходных структур использовали PDB ID: 1YM3 и 2A5V. Продолжительность каждой

симуляции составляла 300 нс, каждая система рассчитывалась в трёх независимых повторах.

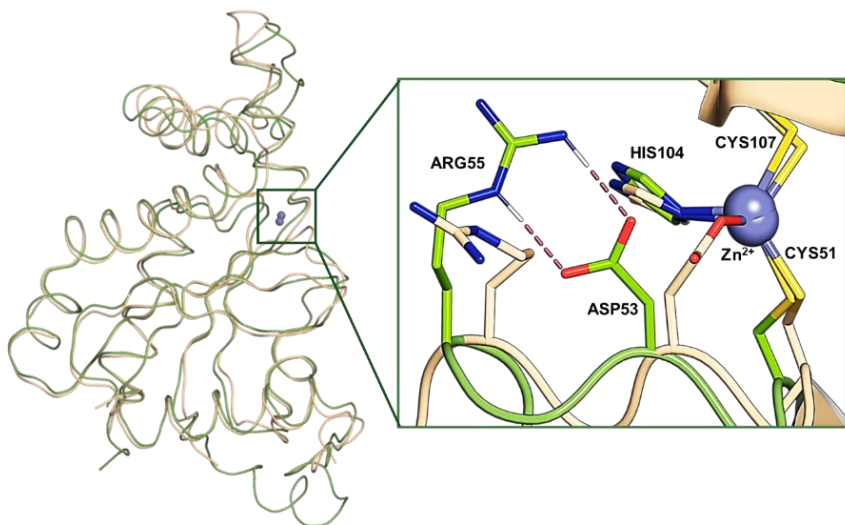


Рис. 6. Сравнение открытой (зелёный, PDB ID: 2A5V) и закрытой (бежевый, PDB ID: 1YM3) конформаций активного центра β -CA mtCA2 *Mycobacterium tuberculosis*. Слева показано наложение мономеров β -CA mtCA2. Справа показаны изменения координации иона Zn^{2+} в активном центре β -CA mtCA2.

Анализ траекторий показал, что положение Asp53 относительно иона Zn^{2+} оставалось стабильным во всех системах на протяжении всего расчётного времени. В закрытых конформациях расстояние Zn^{2+} –Asp53 держалось в пределах 0,197–0,199 нм по всем 18 активным центрам, тогда как в открытых составляло 0,407–0,482 нм — одинаково и в димере, и в тетрамере. Эти диапазоны не перекрывались ни в одном из 36 проанализированных активных центров, а самопроизвольного перехода между конформациями не наблюдалось ни в одной из траекторий (Рис. 7). Расстояния Zn^{2+} –Cys51, Zn^{2+} –His104 и Zn^{2+} –Cys107 также оставались неизменными и воспроизводили значения, характерные для исходных кристаллических структур. Устойчивость открытой конформации дополнительно подтверждал солевой мостик Asp53–Arg55, сохранявшийся во всех кадрах всех открытых траекторий независимо от

олигомерной формы фермента. Конформационная стабильность активного центра сопровождалась сохранением олигомерной сборки. Внутридимерный интерфейс тетрамера оставался устойчивым вне зависимости от конформации активного центра. Димер-димерный интерфейс был более подвижным, однако колебания площади контакта в отдельных повторах не сказывались на геометрии активного центра — это говорит о том, что конформационное состояние не зависит от прочности межсубъединичных контактов.

Полученные данные согласуются с результатами Covarrubias et al. (2006), показавшими присутствие тетрамера mtCA2 при pH 7,5 в отсутствие каталитической активности. Таким образом, открытая и закрытая конформации активного центра β -CA mtCA2 представляют собой устойчивые состояния, не зависящие от олигомерной формы фермента.

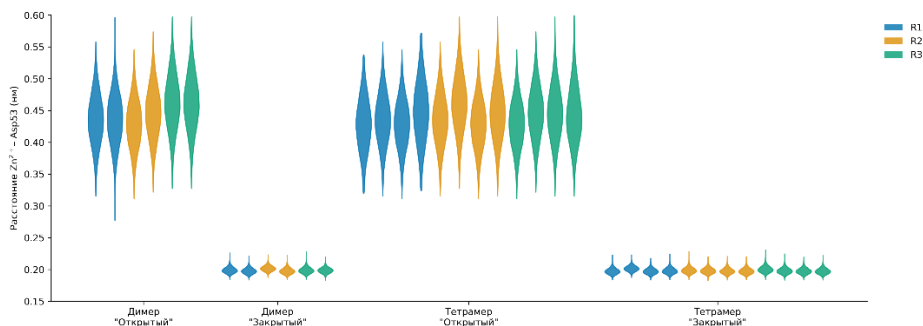


Рис. 7. Распределение расстояний Zn^{2+} –Asp53 в открытой и закрытой конформациях димера и тетрамера mtCA2 по данным МД расчётов. Каждая «скрипка» соответствует одному активному центру в одном из трёх независимых повторов (R1–R3, показаны цветом). По оси ординат — расстояние от иона Zn^{2+} до ближайшего атома кислорода Asp53, нм; по оси абсцисс — система и конформация.

Исследование штаммовой принадлежности EсоCA γ

На первом этапе была уточнена штаммовая принадлежность полноразмерной γ -CA EсоCA γ . BLASTp-анализ показал, что полноразмерные ортологи EсоCA γ выявлены среди представителей родов *Escherichia* и *Shigella*. Белки длиной 256 аминокислотных остатков

обнаружены у штаммов *E. coli* O8, O26, O157:H7, UTI89, АРЕС, а также у *Shigella sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae* и *S. boydii*. Высокая идентичность последовательностей свидетельствует об эволюционной консервативности полноразмерной формы и указывает на то, что ЕсоСА γ является самостоятельной изоформой, характерной для клинически значимых представителей семейства Enterobacteriaceae.

Мембранная ассоциация ЕсоСА γ

Анализ аминокислотной последовательности ЕсоСА γ выявил протяжённый гидрофобный участок в N-концевой области белка, что позволило предположить якорную функцию N-концевого домена — обеспечение мембранной ассоциации белка (Рис. 8).

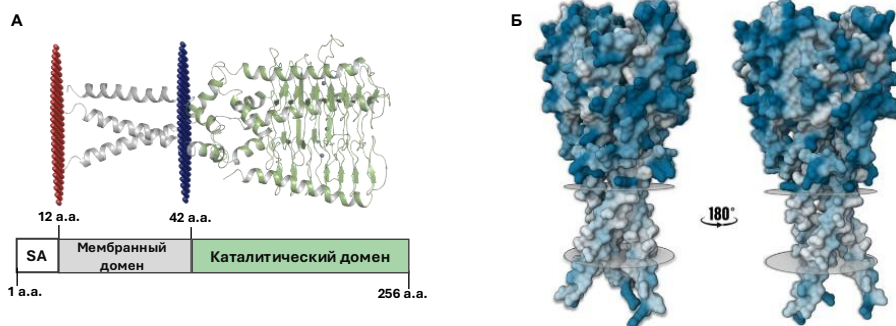


Рис. 8. (А) — доменная архитектура ЕсоСА γ : сигнальный якорь (SA, 1–12 а.о.), трансмембранный домен (ТМ, 13–42 а.о.) и каталитический домен (43–256 а.о.). (Б) — поверхность модели ЕсоСА γ , окрашенная по гидрофобности (два вида, повёрнутых на 180°): синий — полярные участки, белый — гидрофобные. Границы мембраны показаны серыми окружностями (Molstar).

Для проверки этой гипотезы использовали независимые предсказательные алгоритмы TOPCONS, OCTOPUS, SCAMPI, SPOCTOPUS, PolyPhobius, Philius и PPM 3.0. Полученные результаты согласованно указывают на наличие мембранного α -спирального домена в N-концевой области: предсказанная гидрофобная поверхность составляет $42,4 \pm 1,9$ Å, свободная энергия переноса $\Delta G = -64,8$ ккал/моль, угол наклона спирали относительно нормали мембраны $3 \pm 2^\circ$.

Биохимическая достоверность

Опубликованные биохимические данные о высокой каталитической активности EсоСАγ (kcat ~10⁵ с⁻¹) (Del Prete et al., 2020) требуют осторожной интерпретации. В работе 2020 года исследовали модифицированный белок, содержащий на N-конце не только His-тег, но и дополнительный водорастворимый пептид массой около 4 кДа. С учётом выявленного в настоящей работе протяжённого гидрофобного N-концевого домена EсоСАγ остаётся неясным, каким образом белок мог сохранять стабильность в водном растворе. Не исключено, что дополнительный растворимый пептид в составе рекомбинантной конструкции мог частично экранировать гидрофобный домен, что могло повлиять на наблюдаемую каталитическую активность фермента.

Молекулярно-динамический анализ EсоСАγ

Вероятную мембранную ассоциацию EсоСАγ, проверяли молекулярно-динамическими расчётами в двух модельных системах. Первая имитировала мембранное окружение, где N-концевые α-спирали тримера частично погружены в липидный бислой. Вторая система имитировала водный буфер, в котором были получены опубликованные биохимические данные (Рис. 9).

Мембранная система

Водная система

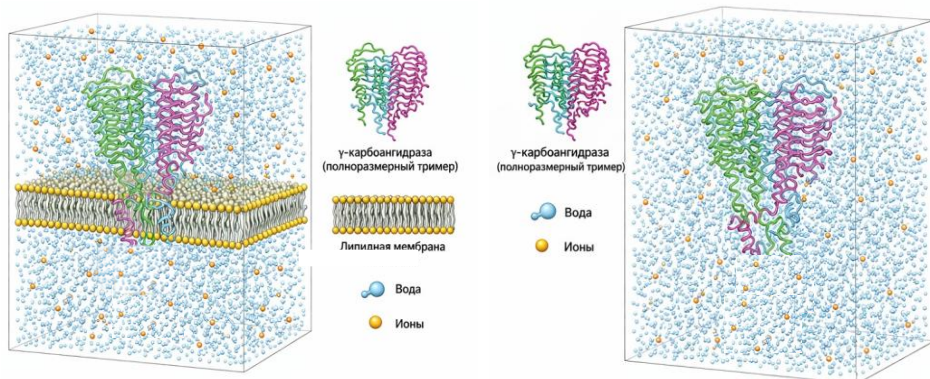


Рис. 9. Модельные системы, использованные для молекулярно-динамических расчётов EсоСАγ.

В мембранной системе радиус гирации EcoCAY остаётся постоянным на уровне $3,0 \pm 0,05$ нм, как и площадь поверхности, доступной растворителю (280 ± 10 нм²) (Рис 10). N-концевые α -спирали сохраняют исходное положение в бислое. Не наблюдается диссоциации тримера и/или белок-мембранного комплекса. Кластерный анализ показал, что свыше 85% траектории описывается двумя и более доминирующими состояниями, что указывает на низкую конформационную подвижность белка в мембранном окружении. В водной системе, напротив, наблюдается компактизация структуры: радиус гирации снижается с 3,6 до 3,4 нм, а площадь поверхности, доступной растворителю уменьшается с 410 до 360 нм² за счёт перестройки N-концевого домена (12–42 а.о.: Rg с 1,8 до 1,6 нм, SASA со 100 до 75 нм²) (Рис 11-13).

В обеих системах каталитический домен остаётся стабильным без значимых конформационных изменений активного центра, что указывает на отсутствие прямого влияния N-концевого домена на активный центр и каталитическую функцию фермента. Следовательно, полученные данные подтверждают гипотезу о том, что N-концевой домен EcoCAY выполняет преимущественно якорную функцию, обеспечивая ассоциацию белка с мембранной.

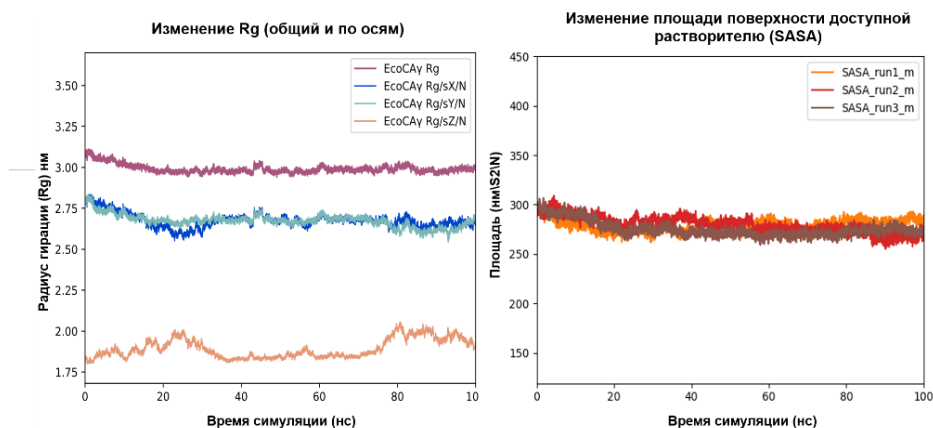


Рис. 10. Изменение Rg и SASA (в 3-х повторах) в мембранной системе.

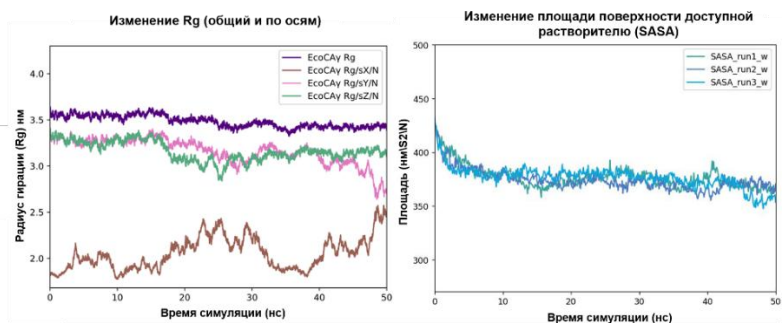


Рис. 11. Изменение Rg и SASA (в 3-х повторях) в водной системе.

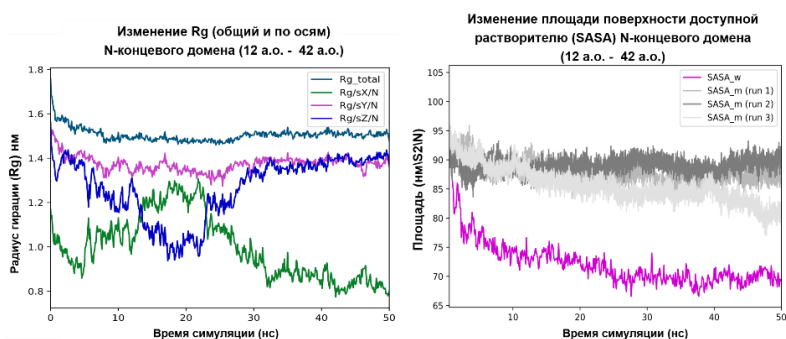


Рис. 12. Изменение Rg и SASA N-концевого домена. SASA в водной системе показана пурпурным цветом, а в мембранной серым (в 3-х повторях).

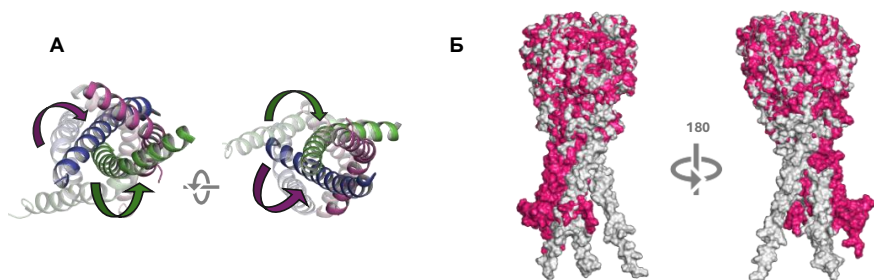


Рис. 13. (А) Компактизация N-концевых α -спиралей в водной модельной системе. Бледные спирали соответствуют исходному положению (0 нс), более насыщенные — положение после 50 нс. (Б) Изменение общей поверхности тримера EcoCay: кадр 0 нс траектории (серый) и кадр 50 нс (пурпурный).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Понимание молекулярных механизмов функционирования карбоангидраз является необходимым условием их практического применения в качестве терапевтических мишеней. Вместе с тем существовавшие пробелы в представлениях о структурной организации и механизмах функционирования α -, β - и γ -СА существенно ограничивали возможности рационального дизайна ингибиторов.

К настоящему времени разработка ингибиторов карбоангидраз опирается преимущественно на принципы, установленные для α -класса. Проведённое исследование свидетельствует о том, что за пределами такого подхода остаётся значительная часть структурного разнообразия этих ферментов. Так, показано, что высокое сродство ингибитора 8V8 к α -СА обеспечивается прежде всего стерической комплементарностью молекулы лиганда полости активного центра, то есть принцип «ключ — замок». Для β -СА показано, что конформации активного центра сохраняются в димерной и тетрамерной формах. Следовательно, обе конформации и обе олигомерные формы могут быть использованы при формулировании новых концепций разработки ингибиторов, исходящих из особенностей самого β -класса. В частности, закрытая конформация задаёт принципиально иной сайт связывания, без координации с металлом, и не имеющий аналогов у α -изоформ человека, что позволит избежать кросс-таргетного воздействия на них. Для γ -СА показано, что N-концевой домен по всей видимости выполняет преимущественно функцию мембранного якоря, не оказывая прямого влияния на активный центр. Вероятная мембранная ассоциация фермента предполагает иной подход к разработке ингибиторов этого класса. Соединение должно достигать фермента вблизи мембраны, что предъявляет особые требования к его липофильности и накоплению.

Таким образом, результаты работы показывают, что для каждого класса карбоангидраз концепции дизайна ингибиторов должны формулироваться самостоятельно, на основе присущих ему структурных особенностей.

ВЫВОДЫ

1. Одним из способов достижения селективности в отношении α -СА II является принцип «ключ–замок», т.е. стерическая комплементарность лиганда поверхности активного центра.
2. Утрата крупной боковой группы Phe в позиции 131 активного центра снижает сродство ингибитора 8V5 к изоформам α -СА IX и α -СА XII, что подтверждает значимость данной позиции при дизайне соединений, селективных к α -СА II.
3. Расчетным путем показано, что открытая и закрытая конформации активного центра β -СА mtCA2 стабильны как в димере, так и в тетрамере. Следовательно, обе олигомерные формы можно рассматривать как структурные модели данной мишени при разработке ингибиторов.
4. Согласно результатам моделирования показано, что N-концевой сегмент EcoCA γ формирует гидрофобный α -спиральный домен, который, по всей видимости, выполняет преимущественно структурную функцию, обеспечивая мембранную ассоциацию фермента. Это позволяет рассматривать EcoCA γ как мембраносвязанную терапевтическую мишень и задаёт иные требования к физико-химическим свойствам её ингибиторов по сравнению с соединениями для цитоплазматических изоформ.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список статей, опубликованных в рецензируемых научных журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus и рекомендуемых ВАК для защиты кандидатских диссертаций:

1. **Stoliarskaia, M. Y.** In silico analysis of the γ -carbonic anhydrase EcoCA γ from Enterobacteria: assessing the role of the 72-residue N-terminal extension / M. Y. Stoliarskaia, O. S. Nikonov, S. S. Borisevich // Journal of biomolecular structure & dynamics. — 2025. — С. 1–15.

2. **Stoliarskaia, M. Y.** Bacterial β -carbonic anhydrases: a six-step prioritization framework for antibacterial target validation / M. Y. Stoliarskaia // Archives of microbiology. — 2026. — № 5. — С. 247.

3. **Stoliarskaia, M. Y.** X-ray analysis of complexes of carbonic anhydrase II with 1,3-oxazole-containing sulfonamide derivatives elucidates the structural basis for their exceptionally high inhibitory potency / M. Y. Stoliarskaia, S. S. Borisevich, E. O. Myaskov [и др.] // Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications. — 2026. — № 82(Pt 4). — С. 125–135.

Список работ, опубликованных в сборниках тезисов конференций:

1. Структурный анализ карбоангидраз в рациональном дизайне новых противоглаукомных препаратов / **М. Я. Столярская**, И. А. Коляденко, А. А. Шетнев, А. Г. Габдулхаков // Сборник тезисов 26-й Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века». — Пущино : ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023. — С. 62–63.

2. **Столярская, М. Я.** Кристаллографические исследования структур комплексов карбоангидраз с ингибиторами нового поколения / М. Я. Столярская // МНСК-2024. Химия: материалы 62-й Международной научной студенческой конференции. — Новосибирск : Новосибирский нац. исследовательский гос. ун-т, 2024. — С. 193.

3. **Столярская, М. Я.** De novo дизайн ингибиторов β -карбоангидраз E. coli / М. Я. Столярская, С. С. Борисевич, О. С. Никонов // 6-я Российская конференция по медицинской химии, приуроченная к 300-летию Российской академии наук. — Нижний Новгород : ООО «АДМИРАЛ ПРИНТ», Москва, ул. Баркляя, д. 13 стр. 1, 2024. — С. 172.

Учебное пособие, опубликованное по теме диссертации:

1. Е. В. Сальников, **М. Я. Столярская**. Кислотно-щелочное равновесие крови и его физиологическое значение. Роль карбоангидраз в его поддержании : учебное пособие / Е. В. Сальников, М. Я. Столярская,. — Ярославль: ООО «Аверс Плюс», 2026. — 56 с. — ISBN 978-5-9527-0637-8.