

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БЕЛКА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Столярская Мария Ярославовна

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

1.5.3. – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
О.С. Никонов

Пущино — 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Семейства карбоангидраз.....	12
1.2. α -СА человека как терапевтические мишени.....	14
1.2.1. Строение активного центра α -карбоангидраз	16
1.2.2. Три поколения ингибиторов α -СА	20
1.3. Бактериальные β -СА	27
1.3.1. История открытия β -СА	27
1.3.2. Структурная организация и классификация	27
1.3.3. Проблема функциональной компенсации β -СА	30
1.3.4. «рН-парадокс».....	31
1.3.5. Проблема селективности	32
1.3.6. Валидация мишени как ключевая проблема.....	33
1.4. Бактериальные γ -СА	34
1.4.1. Открытие γ -класса	34
1.4.2. Функциональные особенности γ -СА	37
1.5. Системный подход к оценке и приоритизации карбоангидраз как терапевтических мишеней	39
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	41
2.1. Объекты исследования.....	41
2.1.1. α -Класс карбоангидраз	41
2.1.2. β -Класс карбоангидраз	41
2.1.3. γ -Класс карбоангидраз	42
2.2. Методологическая система классификации и приоритизации карбоангидраз как терапевтических мишеней.....	42
2.2.1. Критерий 1: Генетическая значимость	43
2.2.2. Критерий 2: Физиологическая роль	43
2.2.3. Критерий 3: Биохимическая достоверность	44
2.2.4. Критерий 4: Структурная интерпретация	45
2.2.5. Критерий 5: Подтверждение связи с фенотипом/патогенезом	45
2.2.6. Критерий 6: Терапевтическая селективность и безопасность	46
2.3. Экспериментальные методы.....	47
2.3.1. Методы генной инженерии и микробиологии	47
2.3.2. Биохимические методы при работе с белком.....	48

2.3.3. Спектрофотометрическое определение концентрации белков	50
2.3.4. Электрофорез белков в ПААГ в присутствии ДСН	50
2.3.5. Сбор дифракционных данных и определение структуры комплексов	51
2.4. Биоинформатические методы	52
2.4.1. Анализ аминокислотной последовательности и структурное выравнивание α -карбоангидраз	52
2.4.2. Анализ аминокислотных последовательностей и уточнение штаммовой принадлежности EсоСА γ	53
2.4.3. Моделирование пространственных структур.....	54
2.4.4. Предсказание мембранной топологии и ориентации EсоСА γ	55
2.5. Вычислительные методы	55
2.5.1. Молекулярная динамика комплексов α -СА II с ингибиторами.....	55
2.5.2. Молекулярная динамика β -СА mtCA2 <i>M. tuberculosis</i>	57
2.5.3. Молекулярная динамика модели гомотримера EсоСА γ в растворе и в мембранном окружении	61
2.5.4. Анализ траекторий молекулярной динамики и визуализация результатов	64
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	68
3.1. Разработка системы критериев для приоритизации карбоангидраз как терапевтических мишеней.....	68
3.1.1. Структура и логика системы валидации	70
3.1.2. Применение системы к различным классам карбоангидраз	73
3.1.3. Значение разработанного подхода	74
3.2. ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ К α -КЛАССУ	75
3.2.1. Получение и очистка α -bCA II	76
3.2.2. Кристаллизация α -bCA II и получение кристаллов комплексов с ингибиторами	79
3.2.3. Определение структур комплексов α -bCA II с ингибиторами 8V5 и 8V8	80
3.2.4. Структурный анализ связывания 8V8.....	82
3.2.5. Структурный анализ связывания 8V5.....	85
3.2.6. Анализ и переуточнение структуры комплекса α -hCA II•8V5 (PDB ID: 5NEE) ..	86
3.2.7. Молекулярно-динамический анализ комплексов α -bCA II с 8V8 и 8V5	88
3.3. ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ К β -КЛАССУ	92
3.3.1. Критерий 1. Генетическая значимость	92
3.3.2. Критерий 2. Физиологическая роль	93
3.3.3. Критерий 3. Биохимическая достоверность.....	94
3.3.4. Критерий 4. Структурная интерпретация	95

3.3.5. Критерий 5. Связь с фенотипом/патогенезом	104
3.3.6. Критерий 6. Селективность и безопасность	105
3.3.7. Классификация β -СА.....	105
3.4. ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ К γ – КЛАССУ	107
3.4.1. Критерий 1. Генетическая значимость ЕсоСА γ	107
3.4.2. Критерий 2. Физиологическая роль ЕсоСА γ	109
3.4.3. Критерий 3. Биохимическая достоверность ЕсоСА γ	112
3.4.4. Критерий 4. Структурная интерпретация ЕсоСА γ	113
3.4.5. Итог по ЕсоСА γ	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
ВЫВОДЫ	125
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	126
СПИСОК ТЕРМИНОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЙ.....	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	130
ПРИЛОЖЕНИЕ А	146
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	146
ПРИЛОЖЕНИЕ В	155
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	156
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	158
БЛАГОДАРНОСТИ	159

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

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 карбоангидраз связано с развитием ряда заболеваний, включая глаукому, эпилепсию, ожирение и опухолевые процессы. В то же время, карбоангидразы 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.

Несмотря на большое количество структурных и биохимических исследований для разных классов карбоангидраз существуют различные ограничения, затрудняющие интерпретацию экспериментальных данных и разработку ингибиторов.

Так, для α -CA основной проблемой остаётся недостаточное понимание молекулярной основы селективности ингибиторов. 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.

Показательным примером являются комплексы α -СА II человека (α -hCA II) с ингибиторами 8V8 и 8V5 (PDB: 5NEA и 5NEE), для которых были показаны пикомолярные значения констант ингибирования [55]. Несмотря на наличие экспериментальных структур, молекулярные механизмы, определяющие 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 СА, не обладающих сопоставимым уровнем сродства к ферменту, поскольку анализ проводился в области связывания лиганда без оценки структуры комплекса в целом и без сравнения с апо-формой фермента.

Одной из центральных проблем β -СА патогенных бактерий остаётся так называемый рН-парадокс — несогласованность между высокой каталитической активностью ферментов *in vitro* при щелочных значениях рН и предполагаемыми условиями их функционирования *in vivo*. Для объяснения данного парадокса около 20 лет назад для β -СА mtCA2 *M. tuberculosis* была предложена модель рН-зависимой активации, связывающая появление каталитической активности с конформационными изменениями активного центра, а также с изменением олигомерной организации фермента. В дальнейшем данная гипотеза начала широко использоваться для интерпретации механизмов работы β -СА различных организмов, несмотря на отсутствие прямых экспериментальных подтверждений для других изоформ. При этом структуры открытого и закрытого состояний mtCA2 были получены при рН 7,0–7,5, где каталитическая активность фермента отсутствует, что не согласуется с предложенной моделью активации. Однако

остаётся неясным, связаны ли конформационные изменения активного центра β -СА с изменением олигомерного состояния фермента.

В свою очередь для γ -СА 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 γ -СА EcoSA γ , обладающая высокой каталитической активностью, несмотря на идентичность её каталитического домена белку YrdA (Park et al., 2012; Del Prete et al., 2020). Основным отличием EcoSA γ от YrdA является наличие дополнительного N-концевого домена 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, для СА различных классов сохраняются ограничения, затрудняющие понимание механизмов их функционирования и оценку их прикладного потенциала. В частности, недостаточно изучена структурная основа селективности ингибиторов α -СА. До сих пор не имеют однозначного объяснения механизмы рН-зависимой активации β -СА. Не установлены причины, по которым γ -СА при наличии идентичного каталитического домена демонстрируют различия в уровне ферментативной активности. В связи с этим, актуальным является комплексное исследование структурных и функциональных особенностей классов карбоангидраз различных и выявление ограничений, препятствующих их практическому использованию в дизайне лекарственных средств.

Цель работы:

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

Задачи исследования:

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Получить препарат белка α -СА II быка в качестве пригодном для кристаллизации. Получить кристаллы комплексов.
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 EсoCA γ в формировании каталитически активной формы фермента.

Научная новизна и практическая ценность исследования

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 -СА, 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 -СА 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 -СА, 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 EcoCA 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.

Основные научные положения, выводы и рекомендации диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры нормальной физиологии с биофизикой Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации при изучении дисциплин «Нормальная физиология человека» и «Основы анатомии и физиологии человека» для студентов по следующим направлениям подготовки (специальностям): 33.02.01 Фармация; 39.03.02 Медицинская биохимия; 30.05.03 Медицинская кибернетика; 31.05.01 Лечебное дело; 31.05.02 Педиатрия; 31.05.03 Стоматология. На основе материалов диссертации подготовлено и опубликовано учебное пособие «Кислотно-щелочное равновесие крови и его физиологическое значение. Роль карбоангидраз в его поддержании» (Е. В. Сальников, М. Я. Столярская — Ярославль: ООО «Аверс Плюс», 2026. — 56 с. — ISBN 978-5-9527-0637-8), используемое при проведении лекционных и практических занятий кафедры (акт о внедрении ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России).

Методология и методы исследования

Выбор объектов исследования определялся задачами, которые предстояло решить для каждого класса CA. Для изучения селективности ингибиторов 8V8 и 8V5 объектом выбрана рекомбинантная α -CA II быка — гомолог α -hCA II (идентичность ~80%). Сопоставление структур комплексов с данными 2017 года позволило выявить контакты, специфичные для α -CA II, и сформулировать принципы селективности ингибиторов к целевой изоформе. Стабильность конформаций активного центра при разных олигомерных состояниях фермента изучена на β -CA mtCA2 из *M. tuberculosis*. Для неё экспериментально разрешены обе конформации активного центра — открытая и закрытая. Молекулярно-

динамическое моделирование показало, устойчива ли каждая из этих конформаций независимо от того, находится фермент в димерной или тетрамерной форме. Гипотезу о мембранной ассоциации проверяли на γ -CA EсoCA γ энтеробактерий, обладающей протяжённым N-концевым доменом с неустановленной функцией. Предсказание пространственной структуры и анализ физико-химических свойств этого домена позволили проверить его роль как мембранного якоря и оценить биологические следствия такой локализации фермента. Для решения задач по α -CA использовали методы молекулярной биологии, а для β - и γ -CA использовались биоинформатические методы, включая предсказательные алгоритмы и МД-симуляции.

Основные научные 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 EсoCA γ формирует гидрофобный α -спиральный домен, который может участвовать в ассоциации фермента с мембраной.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов исследования подтверждается использованием современных биоинформатических и молекулярно-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» (Пущино, 2023), 62-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2024 (Новосибирск, 2024), 6-й Российской конференции по медицинской химии (Нижний Новгород, 2024).

Личный вклад автора

Основные результаты работы получены автором лично. Автор принимал непосредственное участие на всех этапах исследования, включая постановку задач, получение препарата белка bSA 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 -SA, были выполнены совместно с Борисевич Софией Станиславовной (Уфимский институт химии РАН).

Место выполнения работы

Работа выполнена в лаборатории структурных исследований аппарата трансляции Института белка РАН, г. Пущино.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Семейства карбоангидраз

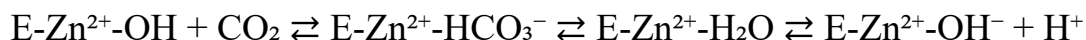
Карбоангидразы (СА; ЕС 4.2.1.1) представляют собой семейство металлоферментов, катализирующих обратимую реакцию гидратации диоксида углерода

$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ [1, 2, 62]. Данная реакция ускоряется ферментами карбоангидразами в 10^6 – 10^7 раз по сравнению со спонтанным процессом, что определяет их фундаментальную роль в поддержании кислотно-щелочного гомеостаза, транспорте CO_2 , а также в снабжении бикарбонатом ключевых биосинтетических путей — глюконеогенеза, липогенеза, синтеза пиримидинов и мочевины [3 - 5].

К настоящему времени идентифицировано восемь эволюционно независимых классов СА: α , β , γ , δ , ζ , η , θ и ι [6, 7] (Рисунок 1). Эти классы существенно различаются по аминокислотной последовательности, пространственной организации, природе каталитически активного металла и филогенетическому распределению. Степень гомологии между классами, как правило, не превышает 15 % [6, 7]. Несмотря на выраженные различия, для всех классов общим является участие иона металла в организации активного центра. В большинстве случаев таким металлом является Zn^{2+} , находящийся в тетраэдрической координации. Вместе с тем для ряда организмов показано, что Zn^{2+} может замещаться другими двухвалентными металлами, в частности Cd^{2+} , Fe^{2+} или Co^{2+} , с частичным сохранением каталитической активности *in vitro*. Подобные замещения рассматриваются как один из механизмов адаптации к специфическим экологическим условиям, в частности к дефициту цинка у диатомовых водорослей [1, 2].

Каталитический механизм включает депротонирование связанной с Zn^{2+} молекулы воды с образованием нуклеофильной частицы Zn-OH^- , атакующей молекулу CO_2 . При этом ион цинка стабилизирует переходное состояние и снижает энергию активации реакции на 12–15 ккал/моль по сравнению с некаталитическим

процессом [8–11]. Именно этот гидроксид-ион (Zn-OH^-) взаимодействует с CO_2 , обеспечивая быстрое образование HCO_3^- :



Где:

- E — фермент карбоангидраза
- Zn^{2+} — ион цинка в активном центре

Природа координирующих лигандов у иона металла варьирует в зависимости от класса фермента. Так, в α - и γ -классах ион металла координирован тремя остатками гистидина, тогда как в β -классе — двумя остатками цистеина и одним остатком гистидина. Четвёртым лигандом в каталитически активном состоянии обычно выступает молекула воды или гидроксид-ион [1, 2].

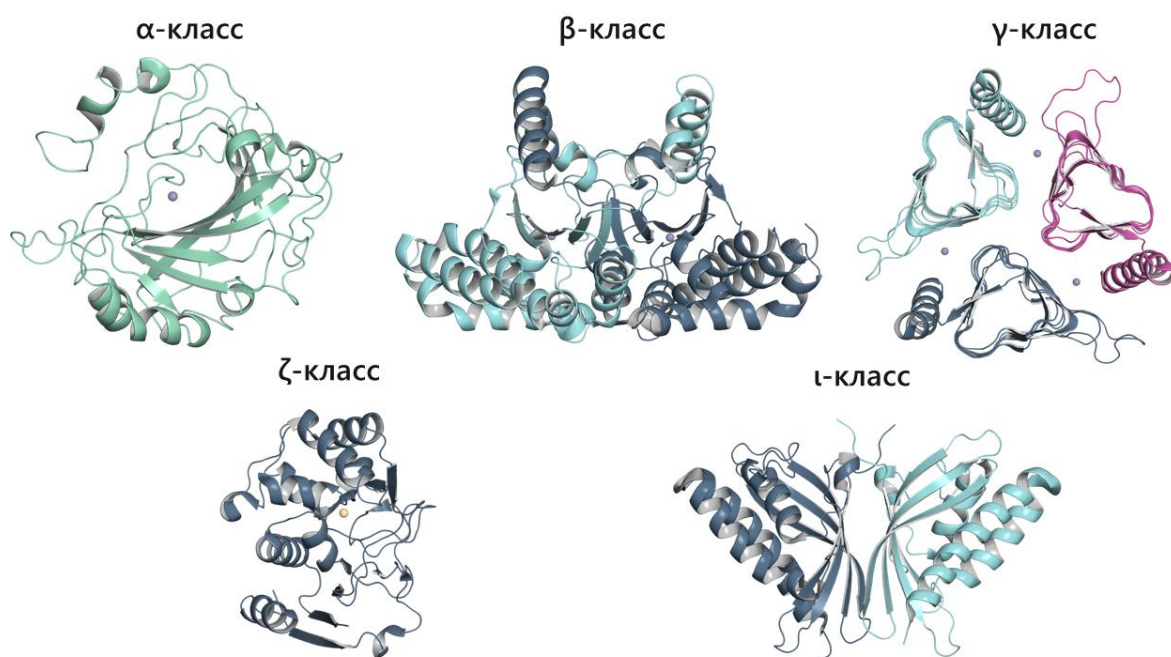


Рисунок 1. Пространственные структуры различных классов карбоангидраз: α (PDB: 1CA2, мономер), β (PDB: 1I6O, димер), γ (PDB: 3TIO, тример), ζ (PDB: 3BOB, мономер) и ι (PDB: 7C5V, димер). Для классов δ , η и θ структуры не определены. Элементы вторичной структуры показаны в ленточной модели, ион Zn^{2+} — серой сферой, ион Cd^{2+} — жёлтой сферой. Олигомерные формы окрашены по цепям.

Филогенетическое распределение карбоангидраз имеет важное значение для понимания их физиологической роли и фармакологического потенциала. α -СА обнаружены у позвоночных, простейших, водорослей, зелёных растений и многих грамотрицательных бактерий. β -СА широко представлены у грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также у растений, грибов и некоторых архей. γ -СА выявлены у архей, цианобактерий и большинства бактерий [12–20]. Остальные классы карбоангидраз — δ , ζ , η , θ и ι — характеризуются более ограниченным распространением и встречаются преимущественно у простейших, диатомовых водорослей и отдельных бактериальных таксонов [6, 7, 16, 17, 38, 40].

В пределах одного класса карбоангидразы могут быть представлены несколькими изоформами, различающимися по клеточной локализации, кинетическим характеристикам и другим функциональным свойствам [21]. Помимо участия в регуляции pH, газообмене и обеспечении биосинтетических процессов бикарбонатом, карбоангидразы могут выполнять структурные функции и быть вовлечены в патологические процессы, включая онкогенез и кальцификацию [22, 23].

В организме человека и других позвоночных представлены исключительно α -СА, образующие семейство из 15 изоформ (СА I–XIV) [21] (Таблица 1). В то же время β - и γ -СА, широко распространены у бактерий и архей, а у позвоночных отсутствуют [16]. Это обуславливает перспективность β - и γ -классов как мишеней для разработки селективных антибактериальных ингибиторов. Таким образом, именно α -, β - и γ -СА представляют наибольший интерес в контексте сравнительного структурно-функционального анализа и оценки их фармакологического потенциала.

1.2. α -СА человека как терапевтические мишени

Клиническое значение α -СА определяется их участием в ряде важных физиологических процессов. Эти ферменты обеспечивают транспорт CO_2 эритроцитами, реабсорбцию бикарбоната в почках, секрецию желудочной кислоты,

образование цереброспинальной жидкости и водянистой влаги глаза, а также регуляцию кислотно-щелочного равновесия крови и тканей [24].

В последние годы особое внимание привлекают мембранно-ассоциированные изоформы СА α -hCA IX и α -hCA XII, экспрессия генов которых резко возрастает в условиях тканевой гипоксии. Установлено, что синтез данных ферментов регулируется гипоксия-индуцируемым фактором HIF-1 α , играющим ключевую роль в адаптации клеток к дефициту кислорода. Повышенная экспрессия генов α -hCA IX и α -hCA XII характерна для многих солидных опухолей, включая рак молочной железы, почки, лёгкого и шейки матки. Функциональная роль указанных изоформ связана с регуляцией внеклеточного pH и поддержанием кислотно-щелочного состояния опухолевого микроокружения. За счёт ускоренного образования H^+ и HCO_3^- карбоангидразы способствуют закислению внеклеточной среды, что создаёт благоприятные условия для опухолевой инвазии, ангиогенеза и формирования устойчивости к противоопухолевой терапии. В связи с этим α -hCA IX рассматривается не только как маркёр гипоксии и неблагоприятного прогноза опухолевого процесса, но и как перспективная мишень для разработки селективных противоопухолевых препаратов.

Не меньший интерес представляют изоформы СА, участвующие в регуляции функций нервной системы и метаболических процессов. Так, hCA α -VII широко распространена в центральной нервной системе и участвует в регуляции транспорта ионов хлора через ГАМК-рецепторный комплекс, влияя на возбудимость нейронов. Нарушение активности данной изоформы связывают с изменением судорожной готовности, что обусловило применение ингибиторов СА, прежде всего ацетазоламида, в качестве вспомогательных противосудорожных средств. Митохондриальные изоформы α -hCA VA и α -hCA VB обеспечивают образование HCO_3^- для ряда бикарбонат-зависимых биосинтетических реакций, включая глюконеогенез, синтез жирных кислот и цикл мочевины. Особое значение придаётся α -hCA VA печени, рассматриваемой как один из регуляторов энергетического обмена и потенциальная терапевтическая мишень при ожирении и

сахарном диабете 2-го типа. Таким образом, накопленные данные свидетельствуют о чрезвычайно широком физиологическом значении СА и их участии не только в поддержании кислотно-щелочного равновесия, но и в патогенезе онкологических, неврологических и метаболических заболеваний.

Наиболее изученным представителем данного класса является α -СА II человека (α -hCA II), которая на протяжении нескольких десятилетий служит объектом исследований в контексте лечения глаукомы [25, 26]. Фермент локализован в ресничных отростках цилиарного тела глаза, где катализируемая им реакция гидратации CO_2 играет важную роль в регуляции секреции внутриглазной жидкости. Подавление активности α -hCA II снижает образование бикарбоната, уменьшает секрецию водянистой влаги и, как следствие, снижает внутриглазное давление — основной фактор прогрессирования глаукоматозной нейропатии [27–35, 58].

Благодаря высокой каталитической активности, детально изученному строению активного центра и роли в патогенезе глаукомы, α -hCA II рассматривается как модельная изоформа при исследовании структуры и функции α -СА человека. Именно на α -hCA II были сформированы основные представления о механизмах связывания ингибиторов СА различных поколений.

1.2.1. Строение активного центра α -карбоангидраз

α -СА представляют собой мономерные глобулярные белки из 200–300 а.о., формирующие компактную α/β -структуру с центральным β -листом, окружённым α -спиралями [36, 60, 61]. Для отдельных представителей класса описаны гомодимерные формы (Рисунок 2А).

Активный центр α -СА представляет собой коническую полость глубиной около 15 Å, в основании которой расположен каталитический ион Zn^{2+} . Ион цинка координирован тремя остатками гистидина (His94, His96 и His119 в нумерации α -hCA II) и молекулой воды или гидроксид-ионом, выполняющим функцию нуклеофила в ходе катализа [36] (Рисунок 2Б).

В строении активного центра α -СА выделяют две функциональные области. Гидрофобный участок, который обеспечивает связывание молекулы CO_2 , и гидрофильная область, которая содержит упорядоченную сеть молекул воды и полярных аминокислотных остатков, участвующих в переносе протона и завершении каталитического цикла [9, 10] (Рисунок 2В).

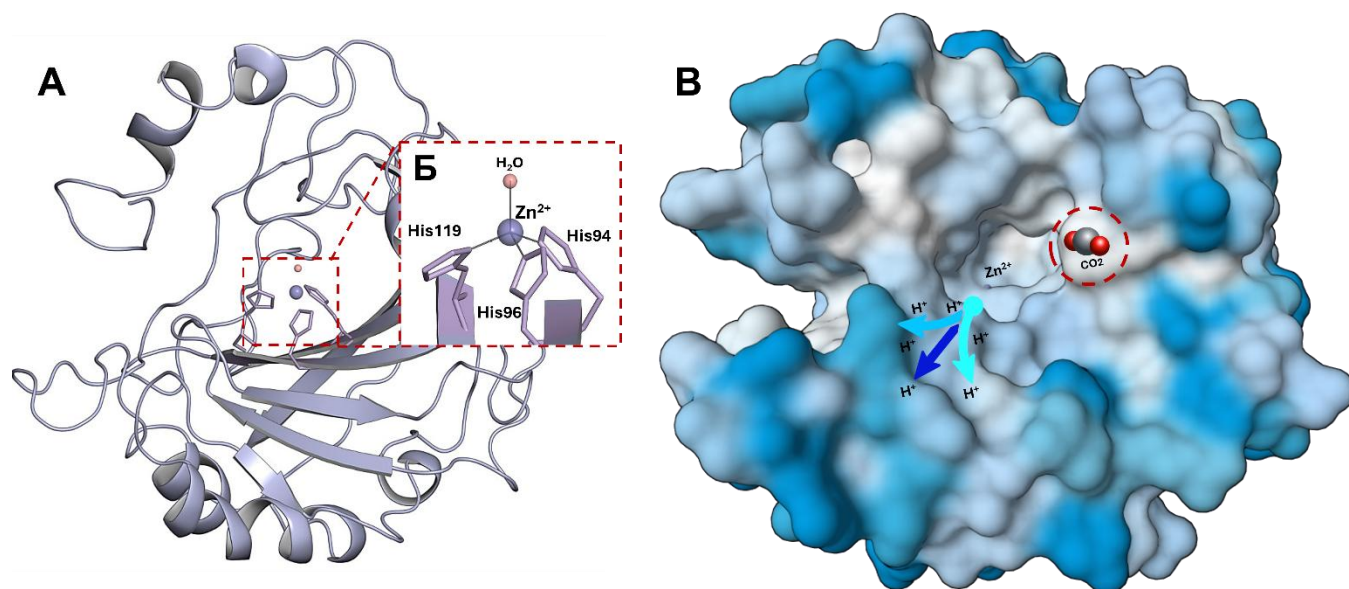


Рисунок 2. Структура активного центра α -hCA II (PDB ID: 1CA2). (А) Пространственная структура α -hCA II в ленточном представлении. (Б) Активный центр α -hCA II: ион Zn^{2+} координирован остатками His94, His96, His119 и молекулой воды. (В) Поверхность α -hCA II, окрашенная по гидрофобности, демонстрирует пространственное разделение гидрофобного и гидрофильного карманов активного центра. Аминокислотные остатки показаны в стержневой модели, ион Zn^{2+} — серой сферой, молекула воды — красной сферой. Нумерация остатков приведена для α -hCA II.

Высокое сходство активных центров α -СА существенно затрудняет создание селективных ингибиторов. Из 15 изоформ α -СА человека 12 являются каталитически активными (Таблица 1). Они различаются по тканевому распределению, внутриклеточной локализации и физиологическим функциям, однако строение их активных центров в значительной мере консервативно [21]: во

всех каталитически активных изоформах ион Zn^{2+} координирован теми же тремя остатками гистидина, а аминокислотные остатки, формирующие гидрофобную и гидрофильную области, в основном сохраняются.

Таблица 1. Изоформы α -карбоангидраз человека и их функциональные характеристики.

Изоформа α-hCA	Олигомерная форма	Клеточная локализация	Тканевая локализация	k_{cat} (s^{-1})	K_i (сульфонамиды, нМ)
α -hCA I	Мономер	цитозоль	эритроциты, ЖКТ	2.0×10^5	250
α -hCA II	Мономер	цитозоль	повсеместно	1.4×10^6	12
α -hCA III	Мономер	цитозоль	мышцы I типа	1.3×10^4	240000
α -hCA IV	Мономер	GPI-якорь, экстрацел.	ЖКТ, почки, эндотелий	1.1×10^6	74
α -hCA VA	Мономер	митохондрии	печень	2.9×10^5	63
α -hCA VB	Мономер	митохондрии	повсеместно	9.5×10^5	54
α -hCA VI	Гомодимер	секреторная	слюна, молоко	3.4×10^5	11
α -hCA VII	Мономер	цитозоль	повсеместно	9.5×10^5	2.5
α -hCA IX	Гомодимер	мембрана	ЖКТ, опухоли	3.8×10^5	16
α -hCA XII	Гомодимер	мембрана, экстрацел.	почки, опухоли	4.2×10^5	5.7
α -hCA XIII	Мономер	цитозоль	повсеместно	1.5×10^5	16

α -hCA XIV	Мономер	мембрана, экстрацел.	почки, сердце, мозг	3.1×10^5	41
α -hCA XV	Мономер	GPI-якорь, экстрацел.	почки	4.7×10^5	72
α -hCA VIII	-	цитозоль (а каталит.)	волокна Пуркинье, cerebellum, лёгкие, печень, слюнные железы	-	-
α -hCA X	-	цитозоль (а каталит.)	мозг (кора, cerebellum), лёгкие, сердце, слюнные железы	-	-
α -hCA XI	-	цитозоль (а каталит.)	волокна Пуркинье, печень, желудок, кишечник, почки, яички	-	-

Примечание: α -hCA VIII, X, XI, XVI — акаталитические изоформы без гидратазной активности (мутации в цинк-связывающем сайте), выполняют регуляторные функции (модуляция IP_3 -рецепторов). α -hCA XV — псевдоген у человека (функциональна у мышей/крыс). Обозначения локализации: цитозоль — растворимая форма в цитоплазме; мембрана — трансмембранный белок; внеклет./GPI-якорь — внеклеточная форма, заякоренная к мембране гликозилфосфатидилинозитолом; секреторная — выделяется в слюну или молоко; митохондрии — матрикс.

Различия между изоформами связаны преимущественно с отдельными аминокислотными заменами в области так называемого селективного кармана активного центра [37]. Наиболее варибельными являются позиции Asn67, Ile91 и Phe131 (Таблица 2). Именно различия в этих положениях, а также в степени

гидрофобности внутренней полости активного центра, создают возможность для разработки соединений с различным сродством к отдельным изоформам. Фрагменты ингибитора, взаимодействуя с вариабельными остатками, позволяют изменять сродство соединения к различным изоформам [37].

Таблица 2. Аминокислотные остатки, формирующие селективный карман активного центра α -СА человека (нумерация по α -hCA II). По данным: PDB ID: 2FOY (hCA I), 3KS3 (hCA II), 3UYN (hCA III), 1ZNC (hCA IV), 1DMX (mCA VA), 3FE4 (hCA VI), 3MDZ (hCA VII), 3IAI (hCA IX), 9R31 (hCA XII), 3DAZ (hCA XIII), 4LU3 (hCA XIV)

Позиция а.о. hCA II	hCA I	hCA II	hCA III	hCA IV	hCA VA*	hCA VI	hCA VII	hCA IX	hCA XII	hCA XIII	hCA XIV
Asn67	H	N	R	M	Q	Q	Q	Q	K	N	Q
Ile91	F	I	R	K	K	Q	K	L	T	R	A
Phe131	L	F	F	V	Y	Y	F	V	A	F	L
Val121	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
Val135	A	V	L	Q	S	Q	A	L	S	A	A
Val141	L	L	L	I	L	L	L	L	L	L	L
Val143	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
Leu198	L	L	F	L	L	L	L	L	L	L	L
Pro202	P	P	T	P	P	P	P	P	P	P	P
Leu204	Y	L	E	D	A	T	S	A	N	L	Y

***Примечание:** для α -hCA VA представлены данные по мышинному ортологу, который имеет высокую гомологию (mCA VA), PDB ID: 1DMX.

1.2.2. Три поколения ингибиторов α -СА

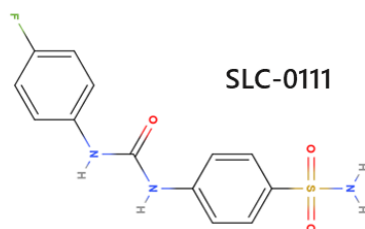
Развитие ингибиторов α -СА принято рассматривать в рамках условного деления на три поколения, отражающего изменение фармакологических задач и уровня понимания механизмов действия этих соединений [3–5, 39]. Несмотря на условность подобного деления, оно широко используется в литературе и позволяет проследить переход от неспецифического подавления ферментативной активности к направленному дизайну соединений с заданным профилем действия [3–5, 39].

Первое поколение — классические сульфонамидные соединения: ацетазоламид, метазоламид, этоксзоламид, разработанные в середине XX века [41, 42] (Рисунок 3). Их действие основано на координации депротонированного сульфонамидного азота с ионом Zn^{2+} активного центра, что блокирует каталитический цикл. Эти соединения обладают высокой активностью в отношении большинства α -изоформ человека, включая hCA II, и применяются при лечении глаукомы, горной болезни, эпилепсии и ряда метаболических нарушений. Вместе с тем клиническое применение ограничено неспецифическим действием на несколько изоформ одновременно, что сопровождается системными побочными эффектами: метаболическим ацидозом, электролитными нарушениями, диспепсией и парестезиями [41, 42].

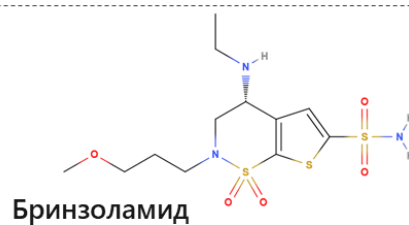
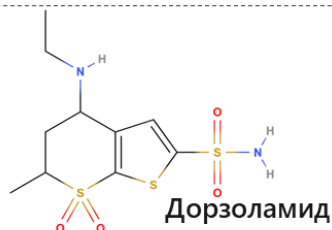
Второе поколение представлено соединениями, оптимизированными по фармакокинетическим свойствам. Типичные представители — дорзоламид и бринзоламид, применяемые в офтальмологии [43, 44] (Рисунок 3). Механизм действия аналогичен соединениям первого поколения; улучшение характеристик достигнуто за счёт подбора липофильности, кислотно-основных свойств и растворимости, что позволило создать препараты для местного применения и существенно снизить системную нагрузку. Снижение побочных эффектов определяется прежде всего способом введения, а не принципиальным различием в сродстве к отдельным изоформам [44].

Третье поколение связано с переходом к направленному молекулярному конструированию ингибиторов *de novo*: основная задача — создание соединений с заданным профилем действия, ориентированных на конкретные изоформы и учитывающих особенности физиологического микроокружения [45–47] (Рисунок 3). К этому поколению относятся ингибиторы, действующие преимущественно на α -hCA IX и α -hCA XII — изоформы, связанные с опухолевым ростом, — а также соединения для офтальмологии. Наиболее изученным примером является SLC-0111, прошедший клинические исследования при лечении солидных опухолей [48–51].

III поколение



II поколение



I поколение

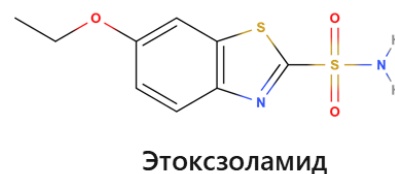
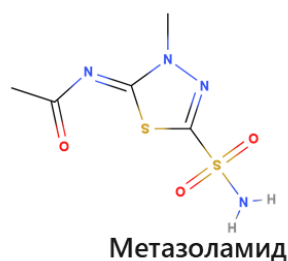


Рисунок 3. Основные представители поколений сульфонамидных ингибиторов. Первое поколение представлено системными препаратами ацетазоламидом, метазоламидом и этоксзоламидом. Второе поколение включает топические ингибиторы дорзоламид и бринзоламид, применяемые в офтальмологии для лечения глаукомы. Третье поколение представлено соединением SLC-0111 — ингибитором, разработанным методом структурно-ориентированного дизайна и селективным к опухоль-ассоциированным изоформам α -hCA IX/XII. Во всех поколениях ингибиторов сульфонамидная группа координируется с ионом Zn^{2+} активного центра фермента.

Молекулярная стратегия конструирования таких соединений описывается концепцией «голова–линкер–хвост» [44, 52–54, 57, 59] (Рисунок 4): координирующая группа («голова»), как правило сульфонамидная, обеспечивает связывание с ионом Zn^{2+} ; линкер определяет геометрию расположения молекулы в активном центре; периферический фрагмент («хвост») взаимодействует с участками у входа в активный центр или в области селективного кармана активного центра, определяя сродство соединения к конкретным изоформам.

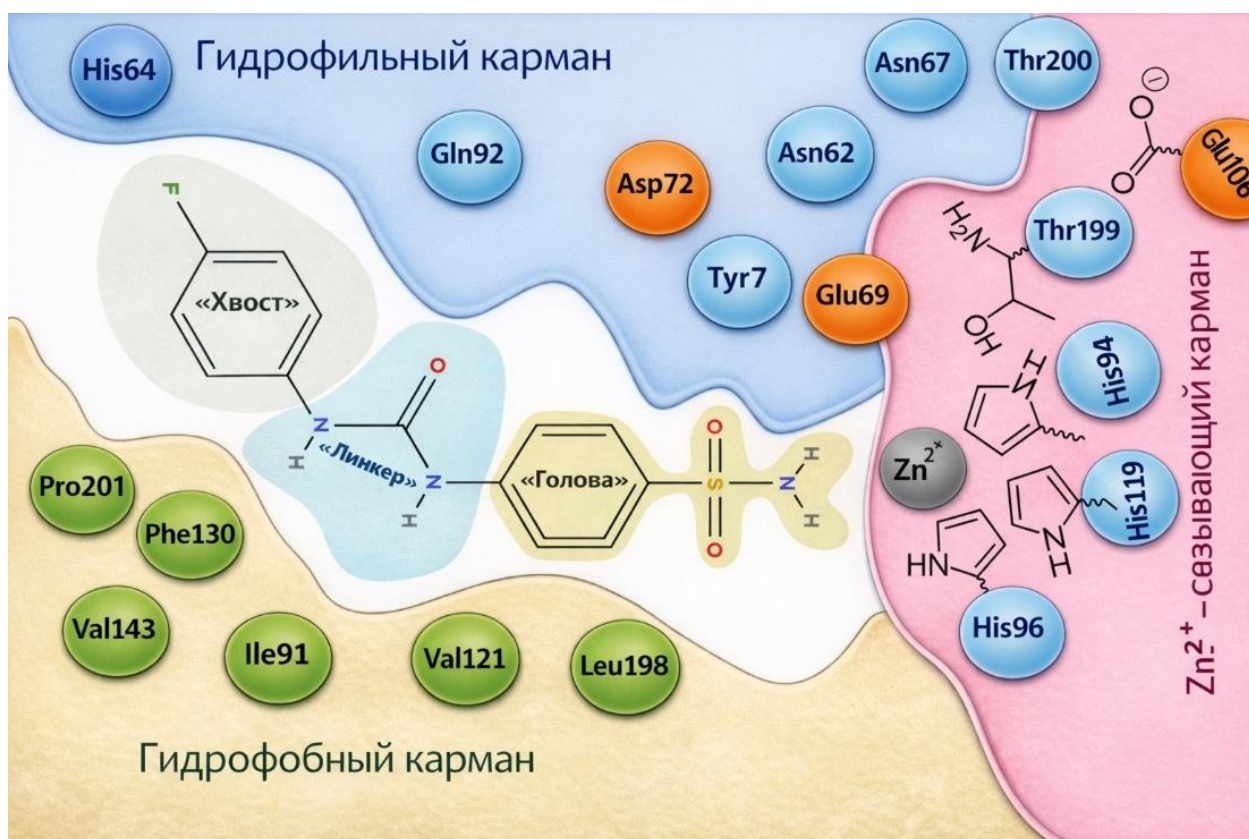


Рисунок 4. Схема взаимодействия ингибитора SLC-0111 с активным центром α -CA. Показаны основные области активного центра: цинк-связывающий карман (розовый), гидрофильная область (голубой) и гидрофобный карман (жёлтый). В структуре ингибитора выделены три функциональных фрагмента: «голова», координирующая ион Zn^{2+} ; «линкер», обеспечивающий позиционирование молекулы в активном центре; и «хвост», взаимодействующий с переменными остатками на выходе из активного центра и определяющий селективность к различным изоформам α -hCA.

Хотя за последние годы был достигнут значительный прогресс в разработке ингибиторов CA, молекулярные основы селективности соединений третьего поколения остаются изученными лишь частично. Показательным примером являются ингибиторы α -CA II человека (α -hCA II) 8V8 и 8V5, для которых были показаны пикомолярные значения констант ингибирования ($K_i \sim 10^{-11} - 10^{-12}$ M) [55]. Несмотря на наличие экспериментальных структур, молекулярные механизмы, определяющие высокое сродство и селективность данных ингибиторов, остаются неизвестными. Это объясняется как особенностями самих кристаллических

структур, так и неполнотой анализа белок-лигандных взаимодействий: для комплекса с 8V5 отсутствует интерпретируемая электронная плотность для морфолинового фрагмента лиганда (Рисунок 5), а для 8V8 описаны преимущественно консервативные взаимодействия, характерные для многих ингибиторов СА, не обладающих сопоставимым уровнем сродства. В обоих случаях анализ проводился без сравнения с апо-формой фермента, что не позволяет оценить индуцированные лигандом конформационные изменения активного центра. Неполнота структурных данных и преимущественно прикладной характер их интерпретации не позволил в полной мере выявить фундаментальные молекулярные механизмы, лежащие в основе высокой селективности и сродства данных соединений к α -СА II.

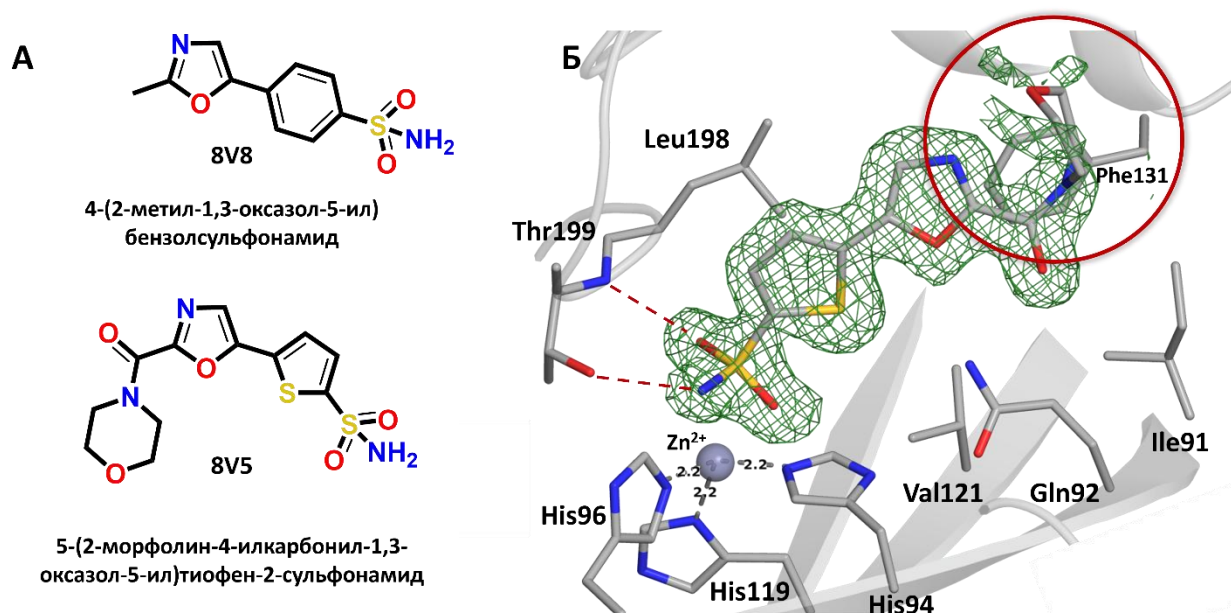


Рисунок 5. (А) Химические формулы и названия соединений 8V8 и 8V5. (Б) Активный центр α -hCA II в комплексе с 8V5 (PDB 5NEE). Электронная плотность (Polder-карта электронной плотности, контур $3,0\sigma$) показана зеленой сеткой. Ключевые а.о. показаны стержнями, ион цинка показан серой сферой. Водородные связи показаны красной пунктирной линией.

Полученные данные свидетельствуют о том, что возможности рентгеноструктурного анализа при исследовании механизмов селективности ингибиторов СА имеют определённые ограничения. В наибольшей степени это

относится к соединениям, содержащим конформационно подвижные периферические фрагменты. Поскольку кристаллографический подход позволяет охарактеризовать лишь отдельные фиксированные состояния белок-лигандного комплекса, динамические аспекты взаимодействия фермента с лигандом при этом остаются вне анализа. Кроме того, для корректной интерпретации механизмов связывания необходимо сопоставление структур комплексов с апо-формой фермента, а также сравнительный анализ с другими α -изоформами по ключевым позициям активного центра, различающимся по сродству к исследуемому соединению. В отсутствие такого сравнения вклад отдельных структурных элементов ингибитора в высокое сродство и чувствительность к конкретной изоформе может оставаться невыясненным даже при наличии структур с высоким разрешением.

В связи с этим при исследовании карбоангидраз широко используют близкородственные модельные системы. Одной из наиболее распространённых моделей является карбоангидраза II быка, характеризующаяся высокой степенью гомологии аминокислотной последовательности с α -hCA II (около 80 % идентичности) и консервативностью пространственной организации активного центра (RMSD по C α -атомам < 0,5 Å; Рисунок 6) [56].

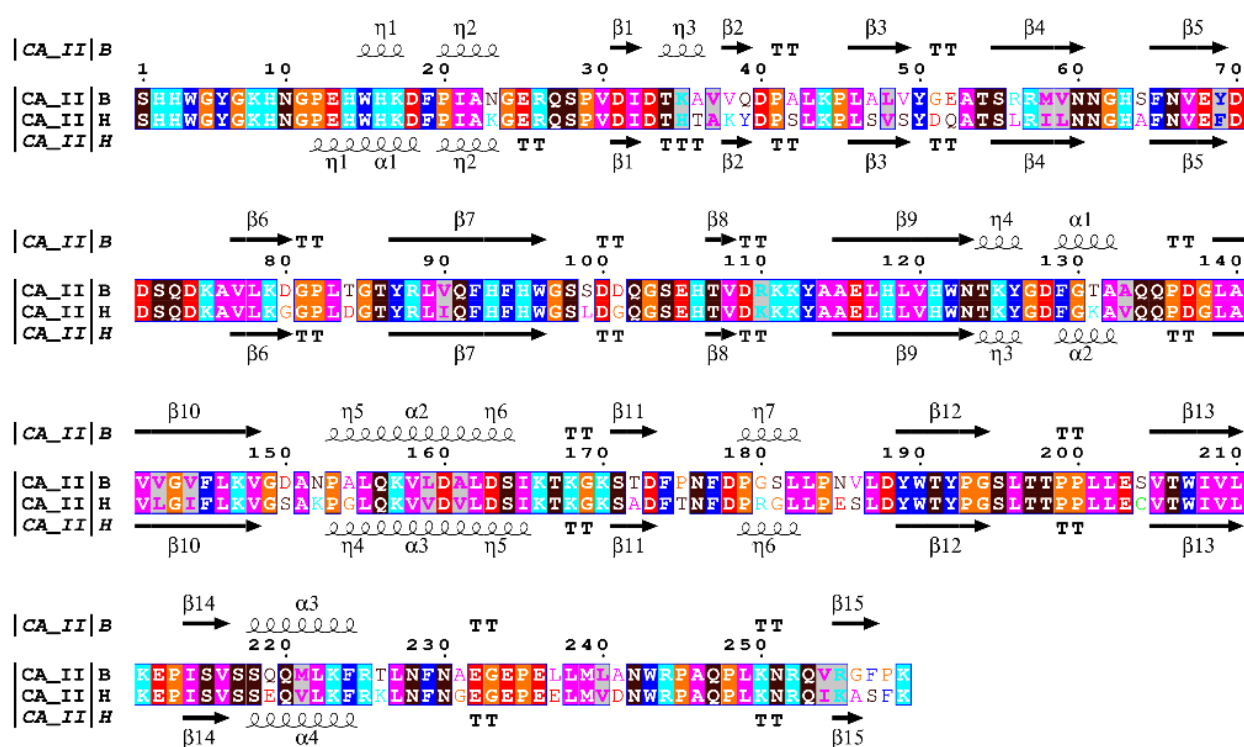


Рисунок 6. Структурное выравнивание последовательностей изоформ α -bCA II (UniProtKB: P00921) и α -hCA II (UniProtKB: P00918). Элементы вторичной структуры указаны выше и ниже соответствующих последовательностей и показаны на основании данных из кристаллических структур: α -bCA II — PDB ID 1V9E (цепь A), α -hCA II — PDB ID 1CA2 (цепь A).

Таким образом, развитие ингибиторов α -CA отражает последовательный переход от эмпирического поиска соединений к структурно-ориентированному молекулярному дизайну. Применение данного подхода позволило получить ингибиторы с исключительно высоким сродством к отдельным изоформам α -CA. Вместе с тем накопленные структурные данные свидетельствуют о том, что молекулярные механизмы, определяющие селективность подобных соединений, во многих случаях остаются недостаточно изученными. Это указывает на необходимость дальнейшего совершенствования подходов к анализу белок-лигандных взаимодействий при исследовании ингибиторов данного класса ферментов.

1.3. Бактериальные β -СА

Если для α -СА человека основной задачей является понимание механизма селективности соединений уже при подтверждённой клинической значимости мишени, то для бактериальных β -СА ситуация носит принципиально иной характер. В данном случае ключевое значение приобретает обоснование выбора самой мишени, то есть вопрос о том, ингибирование какой изоформы действительно приводит к подавлению жизнеспособности патогена в физиологических условиях.

1.3.1. История открытия β -СА

β -СА были впервые описаны в 1939 году Нейшем при исследовании хлоропластов листьев растений [63]. Однако их принадлежность к самостоятельному эволюционно независимому классу карбоангидраз была установлена значительно позднее, с развитием методов молекулярной биологии и сравнительного анализа аминокислотных последовательностей. Первые сведения о наличии карбоангидраз у бактерий относятся к 1963 году, когда соответствующий фермент был обнаружен у *Neisseria gonorrhoeae* [64, 67, 68]. Последующее развитие структурно-биохимических исследований позволило показать, что бактериальные карбоангидразы не относятся к α -классу ферментов позвоночных. Первая β -СА прокариотического происхождения была выделена и охарактеризована в 2000–2001 годах из архея *Methanobacterium thermoautotrophicum* группой Джеймса Ферри, что положило начало систематическому изучению β -СА у бактерий и архей [65, 66]. В настоящее время β -СА выявлены у эубактерий, архей, дрожжей и различных фотосинтезирующих организмов [13, 16, 67, 68].

1.3.2. Структурная организация и классификация

Структурные исследования β -СА начались с определения кристаллической структуры фермента из красной водоросли *Porphyridium purpureum* в 1998 году. В этой работе была показана характерная для β -СА тетраэдрическая координация иона Zn^{2+} , а также отсутствие структурного сходства с α -классом [69]. В 2001 году были определены структуры β -СА из *E. coli* (CynT2/ECCA) и архея

Methanobacterium thermoautotrophicum [65, 66, 70]. В 2004 году для β -СА *M. tuberculosis* впервые описаны два конформационных состояния активного центра — «открытое» (активное) и «закрытое» (неактивное) — и их зависимость от pH среды [71–73].

По современным представлениям β -СА представляют собой гомодимерные или гомотетрамерные белки, мономер которых представлен α/β -складкой типа Россмана [74] (Рисунок 7А). Активный центр расположен на межсубъединичном интерфейсе (Рисунок 7Б) и включает ион Zn^{2+} , координированный двумя остатками цистеина и одним остатком гистидина (мотив Cys–Хаа–Cys–His). В «открытом» состоянии четвёртым лигандом выступает молекула воды или гидроксид-ион, а в «закрытом» эту позицию занимает боковая группа остатка аспарагиновой кислоты [66, 69, 70].

Внутри класса β -СА принято выделять два структурных типа — тип I и тип II. Они различаются положением гибкой петли, несущей один из цистеиновых лигандов цинка и ключевой остаток аспарагиновой кислоты [70] (Рисунок 8). У ферментов типа I, например mtCA1 из *M. tuberculosis*, эта петля в активном состоянии отведена от иона Zn^{2+} , открывая доступ к субстрату [71–73]. У ферментов типа II — CynT2 *E. coli*, mtCA2 и mtCA3 *M. tuberculosis* — боковая цепь Asp в закрытом состоянии координирует ион Zn^{2+} , вытесняя молекулу воды и блокируя катализ [70, 75–78]. Конформационный переход между двумя состояниями экспериментально подтверждён только для mtCA2 *M. tuberculosis* [71–73].

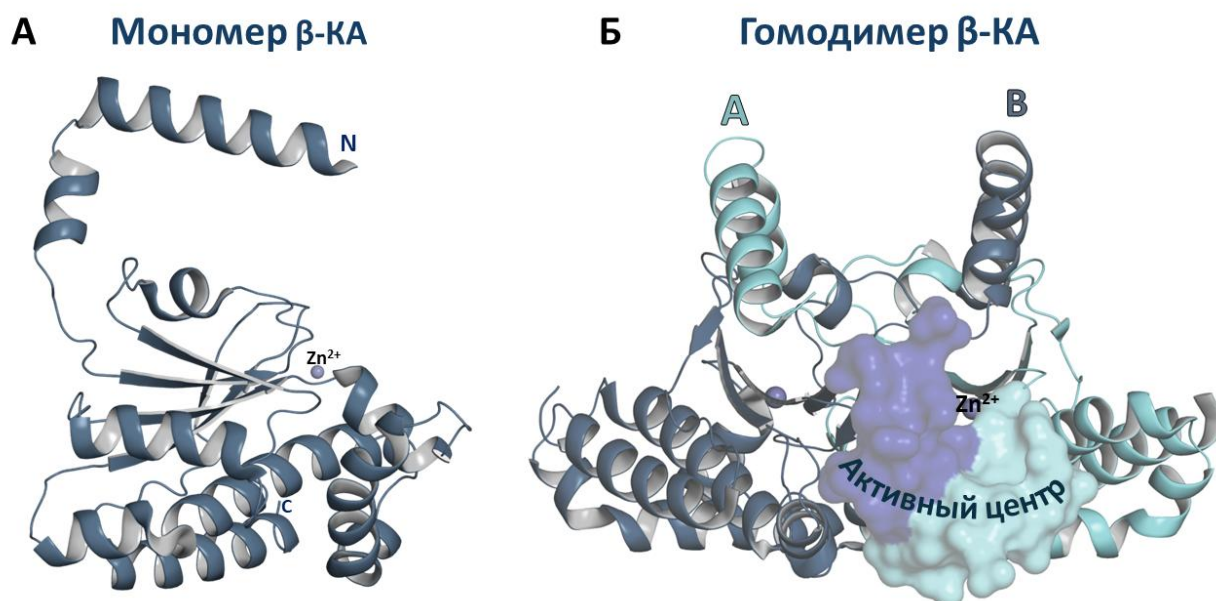


Рисунок 7. Пространственная структура β-КА (на примере β-КА *E. coli*, PDB ID: 1I6P [70]). (А) Мономер β-КА. (Б) Гомодимер β-КА. Мономеры А и В окрашены в синий и голубой цвета соответственно. Активный центр фермента локализован на стыке двух мономеров. Ион цинка (Zn^{2+}) показан в виде сферы.

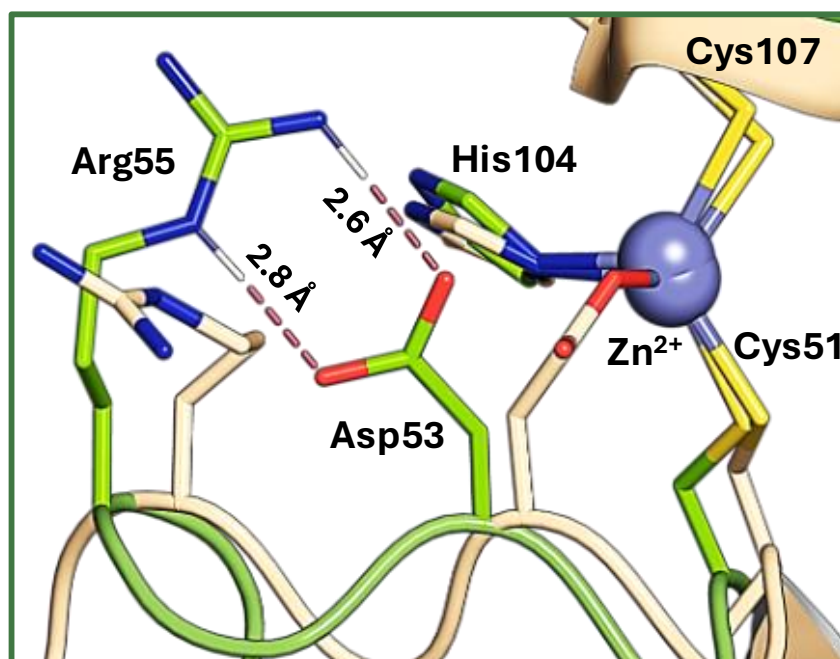


Рисунок 8. Конформационные состояния активного центра β-КА *M. tuberculosis* Rv3588c. Показаны два функциональных состояния активного центра: «открытая» (активная) конформация (PDB ID: 2A5V, зеленый цвет) и «закрытая» (неактивная) конформация (PDB ID: 1YM3, бежевый цвет).

1.3.3. Проблема функциональной компенсации β -СА

Одним из основных препятствий для выбора β -СА в качестве антибактериальной мишени является то, что гены этих ферментов, как правило, представлены в бактериальном геноме несколькими копиями. По данным геномного анализа, бактерии, кодирующие карбоангидразы, содержат в среднем $2,8 \pm 1,6$ копий гена СА на геном, из которых на долю β - и γ -классов приходится $1,1 \pm 0,3$ и $1,6 \pm 0,9$ копий соответственно [84]. Эти гены образуют многочисленные филогенетически обособленные кластеры, что свидетельствует об их адаптивной дивергенции.

Наличие нескольких изоформ определяет выраженную зависимость физиологической роли β -СА от условий среды. Отдельные изоформы могут выполнять частично перекрывающиеся функции. Например, у *E. coli* присутствуют две β -СА — CynT и CynT2. Изоформа CynT представлена в составе оперона и необходима для утилизации цианата в условиях атмосферного CO₂. Однако её нокаут компенсируется повышением содержания CO₂ до 3% [85–89]. Ровно, как и изоформа CynT2, которая требуется для роста культуры в атмосферном воздухе. При этом ее функция компенсируется либо повышенным содержанием CO₂, либо индуцированной экспрессией CynT [87, 88]. Двойной нокаутный мутант остаётся жизнеспособным при повышенном CO₂ [87, 88]. Таким образом, для *E. coli* принципиально важна ферментативная активность СА как таковая, а не конкретная изоформа.

В геноме *P. aeruginosa* (штамм PAO1) идентифицированы три изоформы β -СА: psCA1, psCA2 и psCA3. Однако, только инактивация psCA1 вызывает дефект роста в условиях низкого CO₂ [90–93]. У *M. tuberculosis* также были обнаружены три изоформы, но по данным транспозонного мутагенеза только ген *mtCA2* (Rv3588c) оказался незаменимым для роста *in vivo*. Тогда как ген *mtCA1* (Rv1284) отнесён к условно незаменимым, а *mtCA3* (Rv3273) — аннотирован как несущественный [71–73].

Таким образом, физиологическая роль отдельных β -СА определяется внешними условиями среды и степенью их компенсации другими изоформами. Это создаёт важное ограничение для разработки ингибиторов, поскольку подавление активности одной изоформы *in vitro* не гарантирует антибактериального эффекта *in vivo*.

1.3.4. «рН-парадокс»

Для β -СА патогенных бактерий одной из центральных остаётся проблема несоответствия между высокой каталитической активностью ферментов *in vitro* при щелочных значениях рН и предполагаемыми условиями их функционирования в клетке. Многие бактериальные β -СА типа II, в том числе CynT2 *E. coli*, mtCA2 *M. tuberculosis* и psCA3 *P. aeruginosa*, показывают максимальную каталитическую эффективность (k_{cat}/K_M порядка 10^6 – 10^7 $M^{-1}\cdot s^{-1}$) при рН 8,0–8,5 [70, 73, 85–88, 90, 94]. Между тем внутриклеточный рН нейтрофильных патогенных бактерий поддерживается в диапазоне, близком к нейтральному (~6,5–7,5), независимо от значительных колебаний рН внешней среды [95–99]. Для *M. tuberculosis*, например, показано, что даже при длительной инкубации в среде с рН 4,5 цитоплазматический рН сохраняется на уровне около 7,4 [100, 101].

Для объяснения данного противоречия была предложена модель рН-зависимого конформационного переключения, основанная на данных по mtCA2 *M. tuberculosis*. Согласно этой модели, переход фермента из неактивного («закрытого») в активное («открытое») состояние определяется рН-зависимым конформационным изменением активного центра (Рисунок 8). В кислой среде боковая группа Asp53 координирует ион цинка, блокируя катализ. При защелачивании она отходит и образует солевой мостик с Arg55, открывая активный центр для субстрата [71–73]. Впоследствии данная модель стала использоваться для интерпретации рН-зависимости β -СА различных организмов. Однако прямые экспериментальные данные аналогичного переключения для других изоформ до настоящего времени отсутствуют.

Следует отметить, что кристаллические структуры обоих состояний mtCA2 — открытого (PDB: 2A5V) и закрытого (PDB: 1YM3) — были получены при pH 7,0–7,5 [71–73], то есть в условиях, при которых каталитическая активность фермента практически не регистрируется. Это противоречит предположению о том, что именно переход в открытую конформацию лежит в основе pH-зависимой активации и ставит под сомнение применение данной модели к другим β-СА.

Дополнительным аспектом модели, остающимся малоизученным, является возможная связь конформационных изменений активного центра с перестройкой олигомерной организации фермента. Ряд наблюдений указывает на то, что β-СА могут существовать в растворе в различных олигомерных формах в зависимости от условий среды, включая pH [71–73]. Однако вопрос о том, влияет ли изменение олигомерного состояния на каталитическую активность и является ли оно компонентом механизма pH-зависимой регуляции, остаётся открытым.

1.3.5. Проблема селективности

Большинство ингибиторов бактериальных β-СА, изученных к настоящему времени, относится к классу сульфонамидов и их производных — соединений, разработанных преимущественно против α-СА человека. Многие из них эффективно подавляют бактериальные β-СА *in vitro*, демонстрируя значения K_i в наномолярном диапазоне [106–114]. Вместе с тем высокая активность *in vitro* сама по себе не определяет перспективность соединения, поскольку те же ингибиторы нередко сохраняют сопоставимое сродство к изоформам человека. Это создаёт риск развития системных побочных эффектов.

Показательным примером служат тетразол-содержащие ингибиторы β-СА *E. coli*: наиболее активные соединения 2i и 2p имели K_i около 0,9 мкМ в отношении бактериального фермента и практически такие же значения — 0,86 и 1,87 мкМ соответственно — в отношении hCA II [115]. Для количественной оценки предпочтительности ингибирования используют индекс селективности (ИС):

$$\text{ИС} = \frac{K_i(\text{hCA})}{K_i(\text{бактериальная } \beta\text{-CA})} \quad (1-1)$$

Значения ИС, близкие к 1, указывают на отсутствие селективности. Даже наиболее избирательные из известных ингибиторов характеризуются ИС порядка 10–20 по отношению к hCA II, что, по всей видимости, недостаточно для формирования безопасного терапевтического окна [115–117, 189]. Достижение приемлемого терапевтического окна, вероятно, требует существенно более высокой селективности. На основании анализа опубликованных данных в рамках настоящей работы предложено пороговое значение ИС не менее 100–200 по отношению к ключевым изоформам человека [189].

Отдельную и пока слабо изученную проблему представляет возможное воздействие ингибиторов на карбоангидразы комменсальной микрофлоры. Неспецифическое подавление этих ферментов теоретически может приводить к дисбиозу — нарушению состава микробного сообщества, ассоциированному с риском вторичных инфекций и воспалительных осложнений [115–117].

1.3.6. Валидация мишени как ключевая проблема

Анализ литературы по бактериальным β -СА показывает, что главным ограничением данной области является фрагментарность доказательной базы. За два десятилетия накоплен значительный массив сведений о генетической значимости изоформ, рН-зависимости активности, структурной организации и ингибировании *in vitro*. Однако в большинстве случаев эти сведения существуют разрозненно и лишь изредка формируют целостную доказательную схему вида «мишень → физиологическая роль → ингибирование → антибактериальный эффект».

Иными словами, центральной проблемой при рассмотрении β -СА как лекарственных мишеней остаётся валидация: доказательство того, что ингибирование конкретной изоформы в физиологически значимых условиях приводит к воспроизводимому антибактериальному эффекту. В отсутствие такой связи даже высокая активность *in vitro* не может рассматриваться как достаточное основание для приоритизации β -СА в качестве терапевтической мишени.

1.4. Бактериальные γ -СА

γ -СА рассматриваются как эволюционно наиболее древний класс ферментов семейства карбоангидраз и, по современным представлениям, являются предшественниками остальных его классов [13, 16]. Они широко распространены у грамположительных и грамотрицательных бактерий и наряду с β -изоформами представляют интерес в качестве потенциальных мишеней для антибактериальных препаратов. Вместе с тем, в отличие от α - и β -классов, физиологическая роль γ -СА во многих случаях остаётся неясной. Для значительной части γ -СА функциональная характеристика либо отсутствует, либо основана преимущественно на данных структурной гомологии без достаточного экспериментального подтверждения [20, 118].

1.4.1. Открытие γ -класса

γ -СА были впервые описаны в 1994 году у архей *Methanosarcina thermophila* [119]. Последующие структурные исследования показали, что γ -СА обладают уникальной пространственной структурой, не имеющей сходства с α - и β -классами карбоангидраз. Эти ферменты относятся к суперсемейству LpxA-подобных белков и существуют в виде стабильных гомотримеров, мономеры которых формируют характерную левозакрученную β -спираль ($L\beta H$) (Рисунок 9).

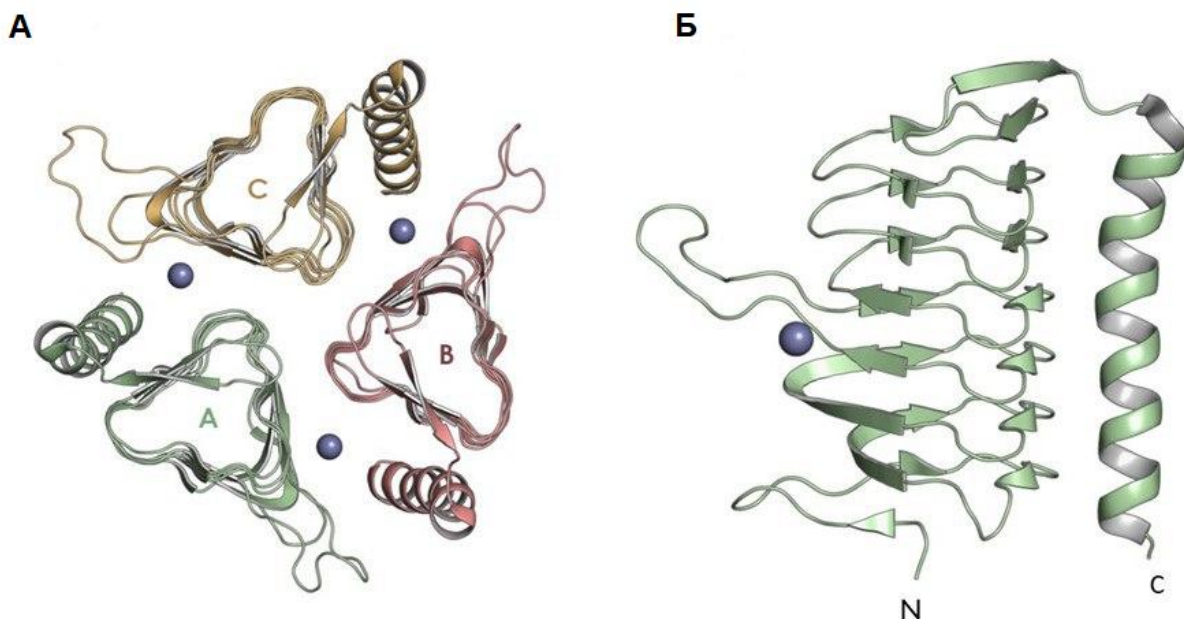


Рисунок 9. Пространственная структура γ -CA (на примере γ -CA *E. coli*, PDB ID: 3TIO [123]). (А) Гомотример белка YrdA. Мономеры А, В и С окрашены в зеленый, розовый и желтый цвета соответственно. Ионы цинка представлены в виде сфер. (Б) Мономер белка YrdA представляет собой левозакрученную β -спираль и С-концевую α -спираль.

Активный центр γ -CA локализован на границе субъединиц тримера. Координация иона металла — обычно Fe^{2+} или Zn^{2+} — осуществляется тремя остатками гистидина, принадлежащими различным мономерам, что является характерной особенностью γ -класса [119, 120]. В дальнейшем было показано, что, подобно β -CA, γ -CA способны существовать в открытом и закрытом состояниях активного центра. В закрытой конформации четвертым лигандом иона металла выступает дополнительный остаток гистидина, например, His70 в структуре γ -CA из *E. coli* [123] (Рисунок 10).

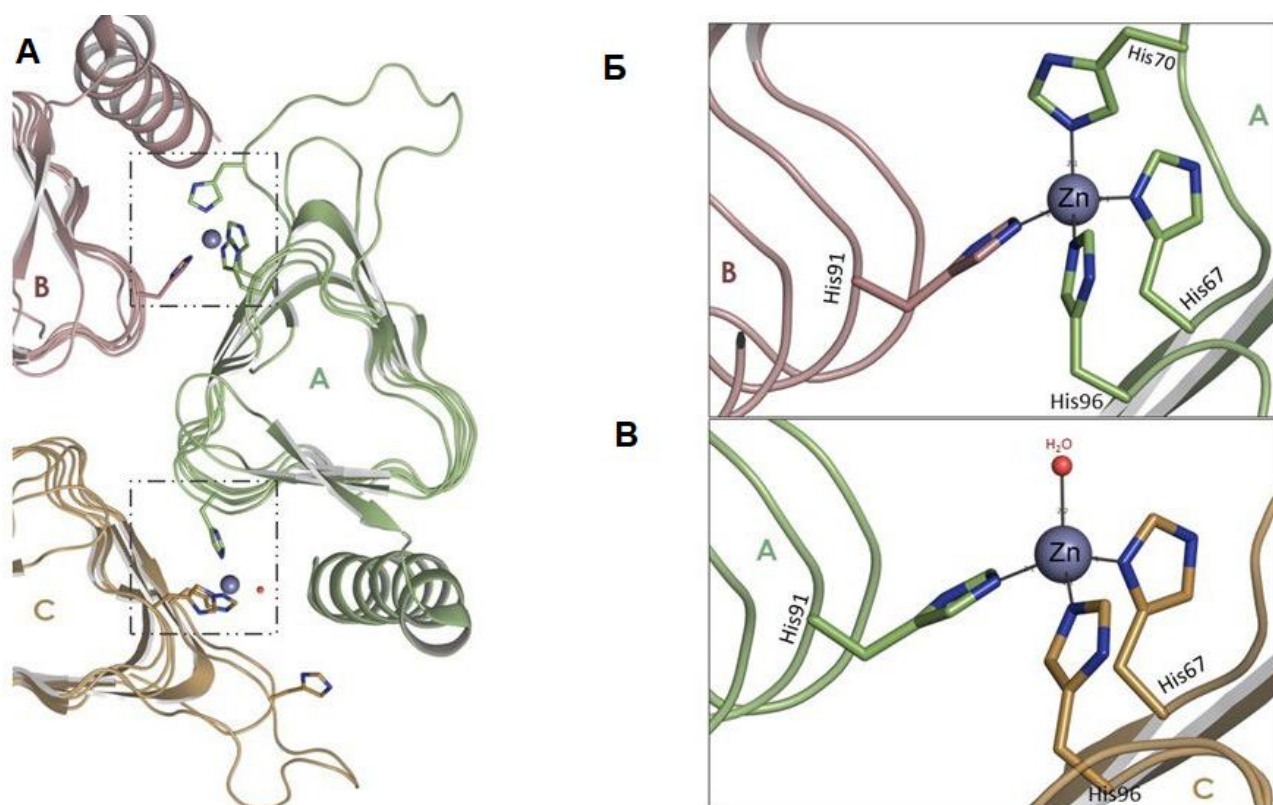


Рисунок 10. Конформационные состояния активного центра γ -СА (на примере γ -СА *E. coli*, PDB ID: 3TIO [123]). Показаны два функциональных состояния активного центра: (A) «закрытая» конформация (PDB ID: 3TIS) и «открытая» конформация (PDB ID: 3TIO). Координация каталитического иона Zn^{2+} (серая сфера) осуществляется остатками His67, His91, His96 и His70. Мономеры А, В и С окрашены в зеленый, розовый и желтый цвета соответственно.

Вместе с тем последующие исследования показали, что наличие γ -подобной складки не всегда связано с гидратацией диоксида углерода. В пределах того же структурного суперсемейства присутствуют белки, не способные катализировать гидратацию CO_2 , в частности ацилтрансфераза LpxA [121]. Более того, для ряда γ -подобных белков, несмотря на высокую структурную консервативность активного центра, каталитическая активность экспериментально подтверждена не была [121, 122]. Это послужило основанием для введения термина « γ -карбоангидразоподобные белки» и подчеркнуло необходимость экспериментального подтверждения функции каждого нового гомолога.

1.4.2. Функциональные особенности γ -СА

Среди представителей γ -класса описаны ферменты, как проявляющие выраженную каталитическую активность, так и белки, для которых способность катализировать гидратацию CO_2 экспериментально не подтверждена [120–124]. К числу каталитически активных представителей относятся фермент Cam из *Methanosarcina thermophila*, PgiCA из *Porphyromonas gingivalis*, γ -СА *Burkholderia pseudomallei*, а также γ -СА *Vibrio cholerae* [119, 125, 126, 128–130]. Для ряда γ -СА показана способность использовать различные металлы-кофакторы, например, Zn^{2+} , Fe^{2+} и Mn^{2+} , в зависимости от их доступности, что указывает на функциональную пластичность данного класса [13, 16]. Наличие каталитически активных γ -СА у патогенных бактерий обусловило интерес к данным ферментам как к потенциальным мишеням.

Вместе с тем для γ -класса характерны случаи, когда наличие γ -подобной пространственной структуры не сопровождается обнаружением ферментативной активности. Наиболее показательным примером является белок YrdA из *Escherichia coli*. Несмотря на типичную для γ -СА организацию активного центра активность YrdA *in vitro* обнаружена не была [123]. Аналогичные наблюдения описаны и для ряда других γ -подобных белков [120, 124]. Это указывает на то, что белки с консервативной укладкой пространственной структуры и единой архитектурой активного центра могут существенно отличаться по каталитическим свойствам.

В связи с этим долгое время считалось, что у *E. coli* отсутствует функционально активная γ -СА. Однако в 2020 году была описана еще одна γ -СА, аннотированная как EсoСА γ [127], которая проявляет ферментативную активность. Главным отличием от YrdA, является наличие дополнительного N-концевого домена длиной 72 а.о., несмотря на абсолютную идентичность каталитического домена (Рисунок 11). Это поднимает вопрос о том, что функция γ -СА, вероятно, определяется не только структурой каталитического домена, но и наличием дополнительных участков белка, способных влиять на каталитическую активность, локализацию или физиологическую роль фермента. Логично было предположить,

что именно этот домен участвует в формировании функционально активной тримерной структуры фермента. Тем не менее конкретная роль N-концевого домена к моменту начала настоящей работы не была выяснена.

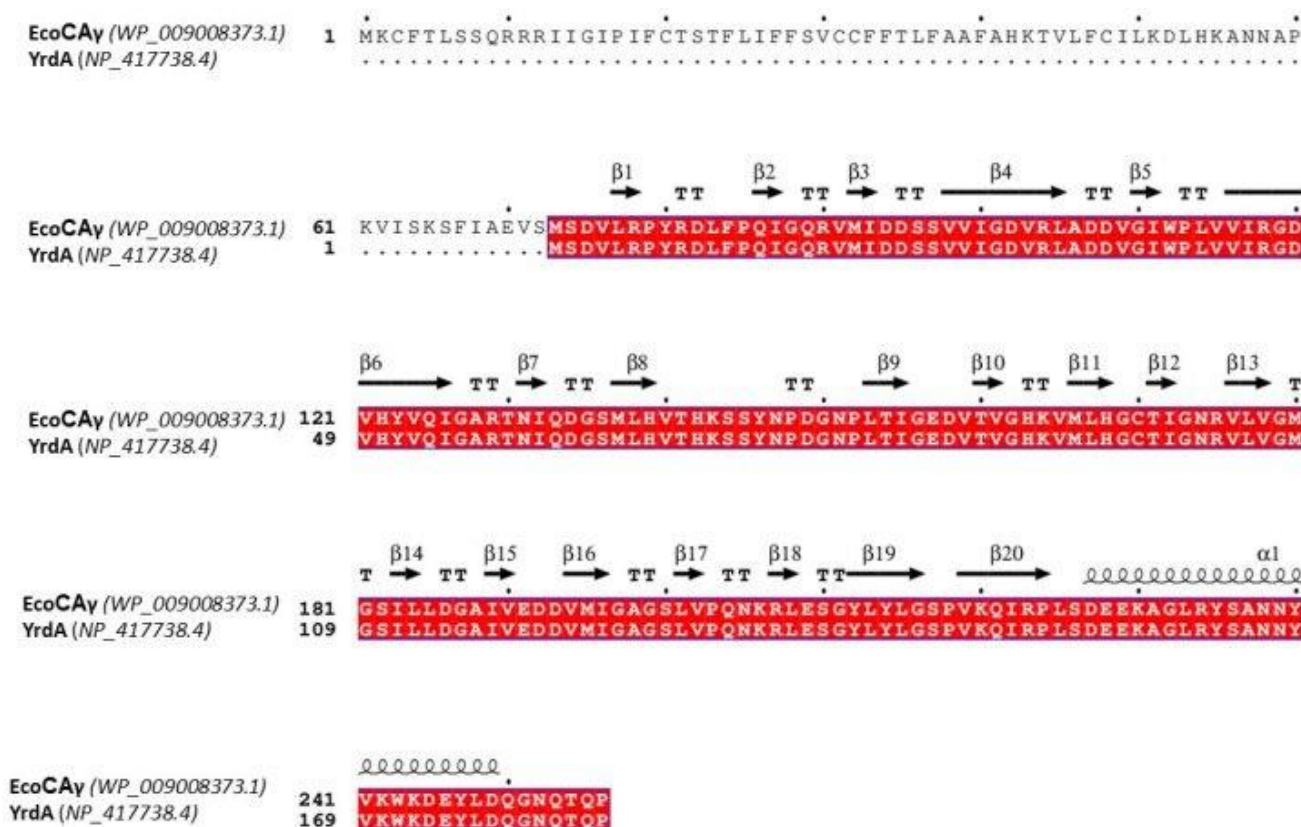


Рисунок 11. Попарное выравнивание аминокислотных последовательностей EcoCAγ (WP_009008373.1) и YrdA (NP_417738.4). Идентичные остатки выделены красным цветом. Элементы вторичной структуры показаны на основе структуры с PDB: 3TIO.

Следует отметить, что в опубликованных работах отсутствовали сведения о гене, кодирующей EcoCAγ, её штаммовой принадлежности и распространённости среди представителей семейства Enterobacteriaceae. Это существенно затрудняло оценку физиологической роли данной изоформы и её вклада в метаболизм клетки.

Более того, для EcoCAγ, как и для ряда других γ-CA бактерий, включая *Vibrio cholerae* [128–130], проведены исследования чувствительности к классическим ингибиторам СА. Во всех случаях значения K_i оказались в наномолярном диапазоне. Высокое сродство ингибиторов к γ-СА уже послужили отправной точкой

для поиска ингибиторов γ -класса с антибактериальным потенциалом. Однако, как и в случае β -СА, отсутствие чёткой физиологической валидации γ -СА существенно ограничивает интерпретацию подобных данных рамками экспериментов *in vitro*.

Таким образом, для γ -СА основной проблемой остаётся отсутствие однозначной связи между структурой белка и его каталитическими свойствами. Наличие характерной γ -подобной складки и консервативного активного центра не позволяет надёжно прогнозировать способность фермента катализировать гидратацию CO_2 . Помимо этого, для ряда γ -СА остаются невыясненными их физиологическая роль, распространённость среди бактерий и механизмы регуляции активности. Всё это существенно ограничивает возможность оценки γ -СА в качестве потенциальных терапевтических мишеней.

1.5. Системный подход к оценке и приоритизации карбоангидраз как терапевтических мишеней

Современные принципы разработки лекарственных средств предполагают поэтапную и строго обоснованную оценку молекулярных мишеней как необходимое условие снижения риска неэффективности и нежелательных эффектов на поздних стадиях исследования [131, 139, 141]. В рамках доклинической работы мишень должна быть последовательно охарактеризована с точки зрения её биологической значимости, роли в патогенезе, причинно-следственной связи между модуляцией мишени и фенотипическим эффектом, достоверности биохимических и интерпретации структурных данных, а также принципиальной возможности избирательного фармакологического воздействия [131–134]. Между тем подобная последовательность редко реализуется на практике в полной мере: данные по различным объектам накапливаются фрагментарно и разновремененно, что порождает необходимость в систематическом инструменте, позволяющем оценивать степень проработки каждого из этапов и выявлять существенные пробелы в доказательной цепочке.

Анализ литературы по карбоангидразам свидетельствует о том, что применительно к данному семейству ферментов указанные принципы реализуются

крайне неравномерно. Структурные и биохимические данные нередко накапливаются без достаточного подтверждения биологической значимости отдельных изоформ и без должного учёта физиологического контекста их функционирования. В итоге причинно-следственная цепочка «мишень — функция — ингибирование — фенотип — избирательность» оказывается выстроена лишь фрагментарно, что существенно затрудняет обоснованную оценку терапевтического потенциала конкретных представителей семейства.

Следует отметить, что в современной литературе предложен ряд подходов к систематизации этапов оценке мишеней [131, 132, 140]. Однако данные подходы, как правило, носят обобщённый характер и не учитывают особенности отдельных семейств ферментов.

Специфика различных классов карбоангидраз определяет и различный характер нерешённых задач. Для α -СА основной проблемой остаётся недостаточное понимание структурных основ селективности ингибиторов: большинство известных соединений действует на несколько изоформ одновременно, что существенно ограничивает их системное применение. Для β - и γ -СА первоочередной задачей является установление физиологической роли отдельных изоформ и её связи с патогенезом. В антибактериальном контексте к этому добавляется необходимость оценки действия ингибиторов на ферменты хозяина и микробиоты [117].

Таким образом, для карбоангидраз всех трёх классов сохраняются ограничения, препятствующие их практическому использованию в качестве терапевтических мишеней. Преодоление этих ограничений требует комплексного подхода, объединяющего структурный и биоинформатический анализ с разработкой чётких критериев оценки и приоритизации изоформ. Именно такой подход реализован в настоящей работе.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты исследования

Объектами настоящего исследования являлись представители трёх эволюционно независимых классов карбоангидраз — α , β и γ .

2.1.1. α -Класс карбоангидраз

α -bCA II была использована для исследования молекулярных детерминант селективного связывания ингибиторов с последующим сопоставлением полученных данных с данными для α -CA II человека.

Для получения рекомбинантной α -bCA II использовали плазмиду pET11c, несущую ген дикого типа *α -bCA II* и ген устойчивости к ампициллину.

Структурный анализ проводили на основе кристаллических структур комплексов α -bCA II с ингибиторами 4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)бензолсульфонамидом (PDB ID: 23ON; идентификатор лиганда: 8V8) и 5-(2-морфолин-4-илкарбонил-1,3-оксазол-5-ил)тиофен-2-сульфонамидом (PDB ID: 23OM; идентификатор лиганда: 8V5), а также структур комплексов α -hCA II с указанными соединениями (PDB ID: 5NEE и 5NEA; идентификаторы лигандов: 8V8 и 8V5).

2.1.2. β -Класс карбоангидраз

В исследование были включены β -CA клинически значимых бактериальных микроорганизмов, для которых в литературе представлены данные о полных нуклеотидных и аминокислотных последовательностях, каталитической активности и ингибировании *in vitro*. В анализ были отобраны девять изоформ: CynT и CynT2 из *E. coli*; mtCA1, mtCA2 и mtCA3 из *M. tuberculosis*; psCA1, psCA2 и psCA3 из *P. aeruginosa*; а также PCA из *S. pneumoniae*.

Отбор изоформ осуществляли на основании аннотированных геномных данных из баз NCBI, UniProt и BioCyc, а также с учётом данных рецензируемых публикаций, содержащих сведения о ферментативных свойствах, чувствительности к ингибиторам и предполагаемой физиологической роли ферментов. В выборку

включались изоформы, для которых доступен сопоставимый объём данных, достаточный для их оценки по разработанной системе критериев.

При наличии экспериментальных структур использовали данные Protein Data Bank (PDB). В случае их отсутствия привлекались расчётные модели из базы AlphaFold.

Поиск и отбор литературы проводили в базах данных PubMed, Scopus и Web of Science. В анализ включались публикации, содержащие экспериментальные или расчётные данные по β -СА: сведения о структуре, каталитической активности и физиологической роли. Приоритет отдавался работам в рецензируемых журналах, обеспечивающим возможность сопоставимого анализа различных изоформ. Полученный массив данных был систематизирован в соответствии с разработанной системой критериев и использован для комплексной оценки β -СА как потенциальных терапевтических мишеней.

2.1.3. γ -Класс карбоангидраз

В рамках исследования γ -класса использовали две аминокислотные последовательности *E. coli*, аннотированные как γ -СА: YrdA (UniProt: P0A9W9) и EcoCA γ (NCBI: WP_009008373.1). Для YrdA также использовали структурные данные (PDB ID: 3TIS, 3TIO). Экспериментальные структуры EcoCA γ к моменту проведения работы отсутствовали; пространственные модели были получены методами расчётного прогнозирования третичной структуры в соответствии с разделом 2.4.3.

2.2. Методологическая система классификации и приоритизации карбоангидраз как терапевтических мишеней

В настоящей работе разработана система валидации и приоритизации молекулярных мишеней, адаптированная к особенностям семейства карбоангидраз. Предложенный подход основан на общепринятых принципах доклинической оценки мишеней [131–134] и представляет собой их формализованную реализацию в виде системы взаимосвязанных критериев.

Детальное описание критериев представлено ниже. Применение данной системы к конкретным изоформам и её использование для приоритизации рассматриваются в главе 3.

2.2.1. Критерий 1: Генетическая значимость

Генетическая значимость рассматривается как фундаментальное свидетельство терапевтического потенциала мишени, поскольку ингибирование продукта такого гена с высокой вероятностью приводит к гибели или остановке роста патогена [145, 146].

В рамках данной системы генетическая значимость оценивалась с использованием аннотированных геномных данных из баз NCBI, UniProt и BioCyc, а также сведений рецензируемых публикаций. Анализ включал: оценку наличия и сохранности гена в геноме микроорганизма, данные о нокаутных или условно-летальных фенотипах (при наличии), а также распространённость и консервативность гена среди клинически значимых штаммов, что позволяет оценить потенциальный охват мишеней при разработке антибактериальных препаратов.

2.2.2. Критерий 2: Физиологическая роль

Физиологическая роль рассматривается как ключевой фактор, определяющий значимость мишени в контексте патогенеза, поскольку биохимическая активность фермента *in vitro* не всегда соответствует его функциональной роли в клетке [132, 145].

В рамках данной системы физиологическая роль оценивалась на основании данных о вовлечённости фермента в метаболические пути, уровне его экспрессии в условиях, имитирующих инфекцию, а также сопоставления каталитических характеристик с предполагаемыми внутриклеточными параметрами среды. Дополнительно оценивалась возможность функциональной компенсации другими изоформами, поскольку она определяет, является ли физиологическая роль данного

фермента уникальной или разделяется с другими членами семейства в пределах одного генома [139].

2.2.3. Критерий 3: Биохимическая достоверность

Биохимическая достоверность рассматривается как оценка того, насколько опубликованные данные об активности и ингибировании фермента соответствуют условиям его предполагаемого функционирования в клетке [135].

Для металлоферментов, к которым относятся карбоангидразы, каталитическая активность принципиально зависит от состояния координационной сферы иона металла, протонационного состояния лигандов активного центра и pH среды. Все эти параметры определяются компартментом, в котором локализован фермент. В связи с этим оценка биохимической достоверности включала два взаимосвязанных аспекта.

Во-первых, качество самих экспериментальных данных. К этому аспекту относятся полученные значения K_i и IC_{50} на очищенном ферменте, воспроизводимость результатов и их согласованность между независимыми исследованиям. Так же смотрели на то какие конструкции использовали для получения рекомбинантного белка. В этом случае учитывали, не вносят ли искусственные модификации белка, такие как, His-тег или дополнительные растворимые пептиды вклад в наблюдаемую активность или чувствительность к ингибиторам.

Затем оценивали, насколько условия проведения эксперимента соответствуют физиологическим условиям. Оценивалось, известна ли субклеточная локализация изоформы и pH соответствующего компартмента. Для цитоплазматических ферментов нейтрофильных бактерий это диапазон ~6,5–7,5. В случаях, когда максимальная активность фермента наблюдалась при щелочных значениях pH, дополнительно оценивали наличие данных, подтверждающих возможность таких условий *in vivo*. Также учитывали структурные механизмы, способные объяснить наблюдаемые явления. При отсутствии этих данных параметр рассматривался как непройденный.

Отсутствие обоснованной связи между условиями эксперимента *in vitro* и предполагаемым физиологическим контекстом рассматривалось как ограничение биохимической достоверности независимо от численных значений K_i [145].

2.2.4. Критерий 4: Структурная интерпретация

Структурная интерпретация **рассматривается как центральный элемент системы**, обеспечивающий понимание молекулярных механизмов связывания ингибиторов и организации активного центра. Действительно, наличие структур представляет собой необходимое условие для рационального дизайна соединений и формулирования обоснованных гипотез о механизме работы активного центра фермента [138]. Набор применяемых подходов определяется характером имеющихся структурных данных и постановкой исследуемого вопроса.

При исследовании молекулярных основ селективности подходы в рамках данного критерия ориентированы на комплексный анализ структур комплексов, а не на описание отдельных контактов в области активного центра. В частности, проводится сравнительный анализ структур комплексов с апо-формами ферментов, а также переуточнение структур, представленных в общедоступных базах данных. Применение методов моделирования и молекулярно-динамических симуляций позволяет проверять существующие гипотезы, в том числе оценивать влияние олигомерного состояния на конформацию активного центра, а также выдвигать собственные гипотезы о субклеточной локализации и доменной организации ферментов. [134].

2.2.5. Критерий 5: Подтверждение связи с фенотипом/патогенезом

Подтверждение связи с фенотипом рассматривается как ключевой этап валидации мишени, позволяющий установить причинно-следственную связь между подавлением её ферментативной активности и наблюдаемым биологическим эффектом [139].

В рамках данной системы данный критерий оценивался на основании опубликованных экспериментальных данных, свидетельствующих о связи между

подавлением ферментативной активности конкретной изоформы и фенотипическими изменениями на клеточном уровне, а также данных, позволяющих исключить вклад гомологичных изоформ и неспецифические механизмы действия.

Критерий считался выполненным при наличии опубликованных результатов, демонстрирующих, что наблюдаемый эффект обусловлен целевым воздействием на данную мишень, а не иными механизмами [139, 142].

2.2.6. Критерий 6: Терапевтическая селективность и безопасность

Терапевтическая селективность и безопасность рассматриваются как обязательный компонент валидации мишени, поскольку перекрёстное ингибирование гомологичных изоформ организма-хозяина и комменсальной микробиоты может существенно ограничивать её терапевтический потенциал [131].

В рамках данной системы данный критерий трактуется как завершающий этап валидации, на котором оценивается возможность избирательного фармакологического воздействия на мишень. При этом анализ проводится не только на уровне наличия селективных соединений, но и с учётом риска перекрёстного взаимодействия, который в ряде опубликованных работ остаётся недостаточно исследованным.

Оценка выполнялась на основании опубликованных количественных данных о чувствительности карбоангидраз человека и микроорганизмов к исследуемым соединениям. Анализ включал сопоставление сродства соединений к целевой изоформе и к гомологичным ферментам: для α -СА — между изоформами человека; для бактериальных β - и γ -СА — по отношению к изоформам человека и изоформам комменсальной микробиоты.

Критерий считался выполненным при наличии подтверждённой селективности в отношении целевой изоформы и отсутствии сопоставимой активности в отношении иных изоформ. Наличие перекрёстного подавления

активности трактовалось как несоответствие критерию безопасности. Отсутствие соответствующих данных рассматривалось как ограничение, препятствующее положительной оценке мишени. Такой подход согласуется с современными представлениями о необходимости ранней оценки профиля безопасности и потенциального влияния на микробиоту на доклиническом этапе разработки [141, 147], а также с регуляторными требованиями, согласно которым избирательность действия и минимизация нежелательных эффектов рассматриваются как обязательные условия при экспертизе лекарственных средств (Решение Совета ЕАЭС № 89, ред. 2023 г.) [141].

2.3. Экспериментальные методы

2.3.1. Методы генной инженерии и микробиологии

2.3.1.1 Трансформация клеток *E. coli* плазмидной ДНК

Для получения рекомбинантной α -bCA II использовали штамм *E. coli* BL21(DE3)pLacRARE, трансформированный плазмидой pET11c, содержащей полноразмерный ген α -bCA II под контролем T7-промотора.

Трансформацию проводили стандартным методом теплового шока. Компетентные клетки инкубировали с плазмидной ДНК, выдерживали на льду в течение 30 минут, затем подвергали тепловому шоку при 42 °C в течение 1 минуты и повторно охлаждали на льду. После добавления среды LB клетки инкубировали при 37 °C в течение 1 часа, затем высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей ампициллин. Чашки инкубировали при 37 °C в течение 12–16 часов до появления отдельных колоний.

2.3.1.2 Экспрессия гена α -bCA II

Одиночную колонию переносили в 25 мл жидкой среды LB и выращивали при 37 °C при интенсивном перемешивании до получения ночной культуры. Полученную культуру переносили в свежую среду LB и выращивали при 37 °C до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0,6$.

Индукцию экспрессии проводили добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 мМ. Для обеспечения корректного включения каталитического иона Zn^{2+} и правильного сворачивания белка одновременно вносили $ZnSO_4$ до конечной концентрации 0,5 мМ. После индукции культуру инкубировали при 18 °С в течение 16 часов. Клеточную массу осаждали центрифугированием при 5 000 g в течение 25 минут при 4 °С.

2.3.2 Биохимические методы при работе с белком

2.3.2.1 Выделение рекомбинантной α-bCA II

Осаждённую клеточную массу ресуспендировали в буфере для лизиса, содержащем 50 мМ Tris–HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl и 0,5 мМ ПМСФ. Разрушение клеток проводили с использованием ультразвукового гомогенизатора EmulsiFlex-S3. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 9 000 g в течение 40 минут при 4 °С. Полученный супернатант использовали для дальнейшей очистки белка.

2.3.2.2 Гидрофобная хроматография

Первый этап очистки белкового препарата проводили методом гидрофобной хроматографии на колонке с Butyl-Sepharose.

Перед нанесением образца к супернатанту добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1,7 М. После полного растворения соли раствор центрифугировали для удаления возможного преципитата.

Колонку предварительно уравнивали буфером, содержащим 50 мМ Tris–HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl и 1,7 М $(NH_4)_2SO_4$. Образец наносили на уравновешенную колонку и инкубировали для обеспечения связывания белка с гидрофобной матрицей. После нанесения колонку промывали стартовым буфером до достижения базовой линии.

Элюцию α-bCA II проводили ступенчатым снижением концентрации сульфата аммония в том же буфере (50 мМ Tris–HCl, pH 7,5; 50 мМ NaCl), последовательно уменьшая концентрацию $(NH_4)_2SO_4$ до 1,0 М, 0,5 М, 0,2 М и далее до полного отсутствия соли.

Полученные фракции анализировали электрофорезом в ПААГ в присутствии ДСН. Фракции, содержащие α -bCA II, объединяли и концентрировали центрифугированием.

2.3.2.3 Эксклюзионная хроматография

Очищенный препарат дополнительно подвергали гель-фильтрации на колонке Superdex G75 16/60. Элюцию проводили буфером, содержащим 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5) и 50 мМ NaCl.

Фракции, соответствующие мономерной форме α -bCA II, объединяли и концентрировали до конечной концентрации 10 мг·мл⁻¹. Чистоту белка контролировали методом электрофореза в 15 % ПААГ в присутствии ДСН по методу Леммли с окрашиванием кумасси G-250.

2.3.2.4 Кристаллизация α -bCA II и получение комплексов с ингибиторами

Кристаллы комплексов α -bCA II с ингибиторами получали методом диффузии «висячая капля». Для получения комплекса раствор белка α -bCA II в концентрации 10 мг/мл смешивали с соответствующим ингибитором (8V5 или 8V8) в молярном соотношении 1:1 и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре.

Каплю формировали смешиванием 1,2 мкл раствора комплекса с 1,2 мкл противораствора, содержащего 2 М (NH₄)₂SO₄ и 100 мМ Tris-HCl (pH 8,5). Каплю наносили на силиконизированное покровное стекло и уравнивали против 250 мкл маточного раствора того же состава.

Кристаллы надлежащего качества вырастали в течение 2–4 суток. Оптимальные условия роста кристаллов наблюдались при температуре 23 °С.

Для повышения воспроизводимости кристаллизации в отдельных экспериментах применяли метод микросидинга. Для улучшения морфологии кристаллов в противораствор добавляли 10 % (w/v) *n*-октил- β -D-глюкопиранозида.

Перед сбором дифракционных данных кристаллы переносили в маточный раствор, содержащий 20 % (v/v) глицерина в качестве криопротектора, после чего быстро замораживали в жидком азоте.

2.3.3. Спектрофотометрическое определение концентрации белков

Концентрацию белков определяли по поглощению в ультрафиолетовой области спектра (200–300 нм) с использованием спектрофотометра «Ultrospec 2100 pro».

Измерение проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути $l = 1$ см. Поглощение (A) разбавленного раствора анализируемого вещества регистрировали при соответствующей длине волны. Концентрацию вещества рассчитывали по закону Бугера–Ламберта–Бера:

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot C \cdot l$$

где

A — оптическая плотность,

ε_{λ} — молярный коэффициент экстинкции ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$),

C — концентрация вещества (M),

l — длина оптического пути (см).

Для белков расчёт молярного коэффициента экстинкции при 280 нм проводили исходя из содержания ароматических аминокислотных остатков:

$$\varepsilon_{280} = 1340 \cdot n(\text{Tyr}) + 5550 \cdot n(\text{Trp})$$

где

$n(\text{Tyr})$ и $n(\text{Trp})$ — число остатков тирозина и триптофана в белке соответственно.

2.3.4. Электрофорез белков в ПААГ в присутствии ДСН

Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях по методу Леммли [150] с некоторыми модификациями в аппарате Mini Gel Tank (Thermo Fisher Scientific). Использовали пластины геля размером 8×8 см толщиной 1 мм. Разделяющий гель содержал 15 % акриламида (соотношение 37.5:1), 0,375 M Tris–HCl (pH 8,8) и 0,1 % ДСН. Для полимеризации к 8 мл раствора добавляли 8 мкл TEMED и 80 мкл 10 % раствора персульфата аммония. Концентрирующий гель содержал 6 % акриламида (37.5:1), 0,125 M Tris–HCl (pH 6,8) и 0,1 % ДСН; для его

полимеризации к 4 мл раствора добавляли 4 мкл ТЕМЕД и 40 мкл 10 % персульфата аммония. Электродный буфер для денатурирующего электрофореза использовали однократно.

К анализируемым образцам добавляли буфер для нанесения ($5\times$ SDS) в объёме одной трети от объёма образца и прогревали при 99 °С в течение 10 минут. После кратковременного центрифугирования образцы наносили в лунки геля. Электрофорез проводили при напряжении 100–120 В до вхождения образцов в разделяющий гель, затем при 160–180 В до выхода фронта бромфенолового синего из геля.

После завершения электрофореза гели окрашивали кипячением в течение 2–5 минут в растворе, содержащем 20 % этанола, 0,5 % кумасси G-250 и 10 % уксусной кислоты. Фоновую окраску удаляли кипячением в дистиллированной воде в течение 10–15 минут (2–3 цикла).

2.3.5. Сбор дифракционных данных и определение структуры комплексов

Дифракционные данные собирали при температуре 100 К с использованием криогенной системы Oxford Cryostream на лабораторной рентгеновской установке Rigaku XtaLAB Synergy-S (Rigaku Oxford Diffraction, The Woodlands, TX, USA). Характеристики детекторной системы описаны ранее [151, 152]. Интеграцию и масштабирование отражений проводили в программе CrysAlisPro, версия 42.89a [153].

Структуры определяли методом молекулярного замещения с использованием программы MolRep [154, 155]. В качестве поисковой модели использовали структуру α -карбоангидразы II быка с разрешением 1.9 Å (PDB ID: 1V9E) [156], из которой предварительно удалили молекулы растворителя и ионы. Асимметричная ячейка содержала два мономера α -bCA II в комплексе с ингибитором (8V5 или 8V8), один ион Zn^{2+} в активном центре, а также упорядоченные молекулы β -октил-D-глюкопиранозида, глицерина, сульфата и воды.

Уточнение структуры проводили в программе REFMAC5 (из пакета CCP4 (версия 8.0.015) [158] с последующей ручной корректировкой в Coot (версия 0.9.8.92) [159]. Финальную валидацию и уточнение осуществляли с использованием пакета Phenix (версия 1.21.2.5419) [160]. Статистика сбора данных и уточнения представлена в Таблице 9.

Атомные координаты и структурные факторы депонированы в Protein Data Bank [161] под кодами PDB ID: 23ON (комплекс с лигандом 8V8) и PDB ID: 23OM (комплекс с лигандом 8V5).

2.4. Биоинформатические методы

В работе использовали биоинформатические методы для анализа аминокислотных последовательностей, структурной организации и геномного контекста карбоангидраз различных классов. Последовательности получали из баз данных NCBI [162] и UniProtKB [163], структурные данные — из RCSB PDB.

Поиск гомологов осуществляли с использованием BLAST+ [164], множественные выравнивания — с применением T-Coffee [165] и Clustal Omega [166]. Визуализацию выравниваний выполняли в ESPript 3.0 [168]. Анализ структур комплексов проводили в Coot, а визуализацию и создание изображений структур и комплексов проводили в PyMOL [167].

Конкретные параметры и особенности анализа для отдельных объектов приведены в разделах 2.4.1–2.4.2.

2.4.1. Анализ аминокислотной последовательности и структурное выравнивание α -карбоангидраз

Для сравнительного анализа α -СА человека и быка проводили структурное выравнивание в два этапа. На первом этапе выполняли попарное выравнивание аминокислотных последовательностей. На втором — сопоставляли элементы вторичной структуры, на основе данных пространственных структур, с соответствующими позициями в выравнивании последовательностей.

Аминокислотные последовательности получали из UniProtKB: для α -bCA II — запись P00921, для α -hCA II — P00918. Попарное выравнивание выполняли с использованием алгоритма T-Coffee с параметрами по умолчанию. При анализе выравнивания особое внимание уделяли консервативности каталитически значимых остатков, участвующих в координации иона Zn^{2+} и формировании активного центра.

Для отображения элементов вторичной структуры на схеме выравнивания использовали кристаллические структуры из RCSB PDB: α -bCA II — PDB ID 1V9E (цепь A), α -hCA II — PDB ID 1CA2 (цепь A) [156, 169]. Визуализацию и аннотирование выравнивания осуществляли в ESPript 3.0; элементы вторичной структуры располагали над выравниванием (α -bCA II) и под ним (α -hCA II).

2.4.2. Анализ аминокислотных последовательностей и уточнение штаммовой принадлежности EcoCA γ

Аминокислотную последовательность γ -CA *E. coli* (EcoCA γ ; accession WP_009008373.1) длиной 256 остатков получали из базы NCBI.

Поиск гомологов выполняли методом BLASTp с использованием пакета BLAST+ (версия 2.16.0+) по базам данных NCBI и UniProtKB [162–164]. В качестве матрицы аминокислотных замен применяли BLOSUM62 [170]; пороговое значение E-value устанавливали равным 10. Поиск проводили с фильтрацией участков низкой сложности, с разрешёнными разрывами в выравнивании и без применения композиционно-зависимой поправки к статистике; максимальное число учитываемых результатов составляло 250. При отборе результатов основное внимание уделяли гомологам с высокой степенью аминокислотной идентичности ($\geq 95\%$) и сопоставимой длиной цепи; дополнительно оценивали полноту покрытия запроса, значение E-value и отсутствие значительных вставок или делеций, способных свидетельствовать о структурной дивергенции.

Для установления расположения гена EcoCA γ в геномах *E. coli* и *Shigella* spp, а также оценки возможной оперонной организации использовали базы данных EcoCyc [171], BioCyc [172] и ShiBase [173]. Анализ включал определение

положения гена на хромосоме, его ориентацию относительно репликативной вилки, идентификацию соседних генов и их функциональную аннотацию, а также оценку вероятной принадлежности к транскрипционной единице. При расхождении аннотаций между базами данных приоритет отдавали сведениям, подтверждённым несколькими независимыми источниками.

2.4.3. Моделирование пространственных структур

Аминокислотная последовательность полноразмерной γ -СА (256 а.о.) из штамма *Shigella dysenteriae* 1 strain 197 получена из UniProt (идентификатор: Q32B70). Данный белок выбран в качестве объекта моделирования, поскольку его последовательность на 100 % идентична последовательности EcoCA γ (accession: WP_009008373.1), при этом для него доступна полная аннотированная запись в базах данных.

Прогнозирование пространственной структуры выполняли методами машинного обучения с использованием AlphaFold2 [174]. Для построения модели гомотримера применяли плагин AlphaFold Multimer v3 [175], позволяющий моделировать мультимерные комплексы с учётом межмолекулярных взаимодействий между тремя мономерами. Моделирование проводили со стандартными параметрами; для каждого варианта входных данных генерировали пять наиболее вероятных моделей сборки.

Качество полученных моделей оценивали по интегрированным метрикам AlphaFold. В качестве результирующей выбрана топ-ранговая модель со средним значением pLDDT = 77,6, pTM = 0,751 и ipTM = 0,748, что свидетельствует о приемлемой достоверности предсказанной глобальной укладки и межсубъединичных интерфейсов.

В предсказанную модель тримера вводили ионы Zn^{2+} в предполагаемые активные центры. Анализ и валидацию тетраэдрической координации ионов цинка проводили в программе Phenix [160]. Корректность расположения ионов металла и межсубъединичных контактов проверяли путём сравнения с экспериментальными структурами гомологичного белка YrdA из *E. coli* (PDB ID: 3TIS, 3TIO) [123].

2.4.4. Предсказание мембранной топологии и ориентации EсоСАγ

Для оценки возможной мембранной ассоциации EсоСАγ анализ проводили в два этапа. На первом этапе по аминокислотной последовательности выполняли предсказание трансмембранных участков и топологии белка с использованием алгоритмов TOPCONS, OCTOPUS, SCAMPI, SPOCTOPUS, PolyPhobius и Philius [177, 178]. Все алгоритмы основаны на оценке гидрофобного профиля последовательности и предсказывают наличие, границы и ориентацию трансмембранных сегментов. На втором этапе оценивали пространственную ориентацию каталитического домена EсоСАγ относительно липидного бислоя с помощью алгоритма PPM 3.0 [176]. В анализ включали пять моделей тримера EсоСАγ с координированными ионами Zn^{2+} , построенных с использованием AlphaFold, в формате PDB. Расчётные значения глубины погружения и положения мембрано-ассоциированных участков оказались идентичными для всех пяти моделей, что свидетельствует о воспроизводимости результатов. Вместе с тем предсказание ориентации каталитического домена относительно мембраны варьировалось: три модели указывали на расположение каталитического домена в цитоплазме, две — в периплазму. Данное расхождение учитывали при интерпретации результатов.

Визуализацию осуществляли в PyMOL [167].

2.5. Вычислительные методы

2.5.1. Молекулярная динамика комплексов α-СА II с ингибиторами

Молекулярно-динамические расчёты проводили для описания характера взаимодействий атомов лигандов с аминокислотными остатками сайта связывания α-СА II. В качестве исходных моделей использовали кристаллические структуры комплексов, полученные в рамках данной работы (раздел 2.3.5): PDB ID 23ON (лиганд 8V8) и PDB ID 23OM (лиганд 8V5).

При подготовке стартовых моделей из структуры комплекса отбирали один мономер α-СА II с лигандом. Второй мономер удаляли. При наличии

альтернативных конформаций боковых цепей аминокислотных остатков оставляли ротамер с наибольшей заселённостью. Кристаллографические молекулы воды, ионы, и иные молекулы удаляли. Протонирование задавали стандартным образом: кислотные остатки — в депротонированной форме (заряд -1), основные — в протонированной (заряд $+1$). Гистидиновые остатки, координирующие каталитический ион Zn^{2+} , моделировали в нейтральных формах для обеспечения корректной геометрии координации и исключения искусственного электростатического отталкивания. Предварительную энергетическую минимизацию подготовленных комплексов выполняли с использованием силового поля OPLS4 [179]. 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.

Подготовленные комплексы помещали в кубическую расчётную ячейку с расстоянием от поверхности белка до границ не менее 10 Å. Ячейку заполняли молекулами воды (модель TIP3P) [180] и добавляли NaCl до концентрации 0,15 M для имитации физиологической ионной силы. Для нейтрализации суммарного заряда системы дополнительно вносили противоионы Na^+ или Cl^- .

Минимизацию энергии системы проводили методом наискорейшего спуска до достижения градиента энергии менее 500 кДж/моль. Уравновешивание проводили в два этапа: в NVT-ансамбле в течение 1 нс с постепенным нагревом до 310 K при наложении позиционных ограничений на тяжёлые атомы белка и лиганда жёсткостью 1000 кДж·моль $^{-1}$ ·нм $^{-2}$, что позволяло молекулам растворителя релаксировать вокруг неподвижного комплекса. Затем в NPT-ансамбле в течение 1 нс при 310 K и давлении 1 бар со снятием ограничений.

Расчёты длительной траектории проводили в ансамбле NPT при температуре 310 K и давлении 1 бар. Длительность расчетов составляла 300 нс. Использовали интегратор RESPA с шагом 2.0 фс, термостатирование по схеме Nose–Hoover chain [181]. Дальнодействующие электростатические взаимодействия учитывали

методом суммирования по Эвальду (PME) с отсечкой 0.9 нм (9 Å). Траекторию записывали с получением 5000 кадров (один кадр каждые 60 пс). Все расчёты выполняли в пакете Desmond (версия 2022-4) [180, 182].

2.5.2. Молекулярная динамика β -CA mtCA2 *M. tuberculosis*

Подготовку систем осуществляли с использованием модуля CHARMM-GUI «Solution Builder» [183]. Молекулярно-динамические симуляции β -CA mtCA2 выполняли в пакете GROMACS 2023.2 [184] с использованием силового поля CHARMM36m [185]. Активный центр β -CA сформирован преимущественно петлевыми участками, а CHARMM36m разрабатывалось в том числе для описания подвижных сегментов белка. Все четыре системы рассчитывали в одном силовом поле по единым протоколам, поэтому их результаты сопоставимы между собой.

Чтобы проверить связь между олигомерным состоянием фермента и конформацией активного центра, собрали четыре расчётные системы: димер и тетрамер mtCA2 в открытом и закрытом состояниях активного центра (Таблица 3). В качестве стартовых моделей использовали структуры: PDB ID 1YM3 (закрытое состояние, с разрешением 1,75 Å) и PDB ID 2A5V (открытое состояние, с разрешением 2,20 Å). Все использованные в работе олигомерные сборки брали из аннотированных биологическихборок в Банке белковых структур. Для 2A5V аннотированы как димерная, так и тетрамерная формы, и они были использованы для формирования системы «открытого» димера и «открытого» тетрамера. Для 1YM3 аннотирована только димерная сборка, и она послужила закрытым димером. Закрытый тетрамер собирали наложением двух копий димера 1YM3 на субъединицы тетрамера 2A5V, взаимное расположение димеров в нём унаследовано от открытой формы.

Таблица 3. Состав расчётных систем mtCA2.

Параметр	Димер (открытый)	Димер (закрытый)	Тетрамер (открытый)	Тетрамер (закрытый)
Конформация активного центра	открытая	закрытая	открытая	закрытая
Стартовая структура (PDB ID)	2A5V	1YM3	2A5V	1YM3 + 2A5V
Разрешение, Å	2,20	1,75	2,20	1,75
Источник сборки	биологическая сборка (димер)	биологическая сборка (димер)	биологическая сборка (тетрамер)	наложение двух димеров 1YM3 на тетрамер 2A5V
Цепей / активных центров	2 / 2	2 / 2	4 / 4	4 / 4
Ребро кубической ячейки, нм	8,5	8,5	11,8	11,8
Ионов Zn^{2+}	2	2	4	4
Na^+ / Cl^-	60 / 48	60 / 48	159 / 135	159 / 135
Молекул воды (TIP3P)	17 106	17 106	47 571	47 571
Всего атомов	57 528	57 528	155 180	155 180

Подготовка структур включала удаление His-тегов в 2A5V, достройку недостающих остатков и выбор одного конформера для остатков с альтернативными положениями боковых цепей. Недостающие остатки достраивали в Coot 0.9.8.95 по последовательности mtCA2 из записи UniProt P9WPJ9: в обеих структурах три остатка на N-конце и два на C-конце, в 1YM3 дополнительно сегмент 32–41, не разрешённый между остатками 31 и 42. Кристаллографические воды, ионы, кроме каталитического Zn^{2+} , и кристаллизационные добавки удаляли; в стартовых структурах открытых систем четвёртая координационная позиция Zn^{2+} при этом оставалась свободной. N- и C-концы протонировали как NH_3^+ и COO^- .

Каждую олигомерную систему помещали в центр периодической прямоугольной расчётной ячейки. Размер ячейки выбирали так, чтобы расстояние от поверхности белка до границ ячейки составляло не менее 12 Å. Водную среду моделировали с применением модели TIP3P. Системы нейтрализовали добавлением ионов Na^+ и Cl^- . Ионная сила была доведена до 0,15 М NaCl. Протонирование ионизируемых остатков задавали для pH 8,4, соответствующего условиям, при которых наблюдается каталитическая активность mtCA2. Кислотные остатки моделировали в депротонированной форме (заряд -1), основные — в протонированной (заряд $+1$). Остатки, координирующие каталитический ион Zn^{2+} (Cys51, Asp53, His104, Cys107), моделировали в депротонированных состояниях для обеспечения корректной геометрии координации и исключения искусственного электростатического отталкивания с ионом металла. Cys51 и Cys107 были смоделированы как тиолаты, а His104 как нейтральный таутомер HSD, координирующий металл через NE2. Для оценки вероятного протонированного состояния остатков Arg55 и Asp53 использовали расчёты pKa с помощью сервера PDB2PQR v3.7.1 и модуля PROPKA 3.5.1 с применением силового поля PARSE. Расчёты pKa указывали на депротонированное состояние Asp53 и протонированное состояние Arg55 в исследуемом диапазоне pH 8.4.

Каталитический ион Zn^{2+} описывали моделью точечного заряда $+2,000$ е, массой 65,37 а.е.м. и параметрами Леннард-Джонса $\sigma = 0,194216$ нм и $\epsilon = 1,046$ кДж·моль $^{-1}$ из стандартного набора ионных параметров CHARMM36m. Никакие ограничения не накладывались на ион или его координационную сферу ни на одном из этапов уравнивания систем.

Минимизацию энергии проводили методом наискорейшего спуска до достижения градиента менее 500 кДж/моль. Уравнивание включало 1 нс в NVT-ансамбле и 1 нс в NPT-ансамбле при 310 К и давлении 1 бар с постепенным снятием позиционных ограничений. Позиционные ограничения составляли 400 и 40 кДж·моль $^{-1}$ ·нм $^{-2}$ на тяжёлые атомы основной и боковых цепей соответственно. Качество уравнивания контролировали по временной стабильности

температуры, плотности и размеров расчётной ячейки на протяжении последних 500 пс стадии NPT (Таблица 4).

Таблица 4. Параметры уравнивания систем молекулярно-динамических расчётов mtCA2.

Параметр	Интервал траектории	Среднее $\pm$ SD
Димер (открытая конформация)		
Температура (К)	500–1000 пс	310.05 $\pm$ 0.20
Размер ячейки (нм) (Box-X; Box-Y; Box-Z)	500–1000 пс	8.532 $\pm$ 0.005
Давление (бар)	500–1000 пс	1.01 $\pm$ 0.13
Димер (закрытая конформация)		
Температура (К)	500–1000 пс	310.01 $\pm$ 0.13
Размер ячейки (нм) (Box-X; Box-Y; Box-Z)	500–1000 пс	8.541 $\pm$ 0.003
Давление (бар)	500–1000 пс	1.02 $\pm$ 0.10
Тетрамер (открытая конформация)		
Температура (К)	500–1000 пс	310.03 $\pm$ 0.38
Размер ячейки (нм) (Box-X; Box-Y; Box-Z)	500–1000 пс	11.778 $\pm$ 0.010
Давление (бар)	500–1000 пс	1.03 $\pm$ 0.10
Тетрамер (закрытая конформация)		
Температура (К)	500–1000 пс	310.03 $\pm$ 0.33
Размер ячейки (нм) (Box-X; Box-Y; Box-Z)	500–1000 пс	11.781 $\pm$ 0.010
Давление (бар)	500–1000 пс	1.03 $\pm$ 0.12

Длительные симуляции проводили в ансамбле NPT при температуре 310 К и давлении 1 бар с шагом интегрирования 2 фс. Связи с участием водорода ограничивали с помощью алгоритма LINCS. Дальнодействующие электростатические взаимодействия рассчитывали методом суммирования по Эвальду (PME) с отсечкой 1.2 нм (12 Å), порядком интерполяции 4 и шагом Фурье

0,16 нм. Для ван-дер-ваальсовых взаимодействий использовали модификатор force-switch в диапазоне 1,0–1,2 нм вместе с дальнедействующей дисперсионной поправкой к энергии и давлению. Списки соседей строили по схеме Verlet и обновляли каждые 20 шагов. Температуру поддерживали термостатом V-rescale, давление — баростатом Parrinello–Rahman.

Длительность каждой симуляции составляла 300 нс. Для повышения статистической надёжности каждую систему рассчитывали в трёх независимых повторях, что составило 900 нс на систему и суммарное время симуляций 3,6 мкс.

2.5.3. Молекулярная динамика модели гомотримера EсоСАγ в растворе и в мембранном окружении

Подготовку систем для молекулярной динамики EсоСАγ осуществляли с использованием модулей CHARMM-GUI "Membrane Builder" и "Solution Builder" [183]. В рамках работы были сформированы две расчётные системы: (1) гомотример EсоСАγ в водно-солевом растворе (имитация буферной среды) и (2) гомотример EсоСАγ, частично погружённый в липидный бислой, окружённый растворителем. Все молекулярно-динамические симуляции EсоСАγ выполняли в пакете GROMACS 2023.2 [184] с использованием силового поля CHARMM36m для водных и мембранных систем [185]. Поскольку единое силовое поле для обеих систем обеспечивает корректность их прямого сравнения в рамках данной работы было выбрано силовое поле CHARMM36m. Это силовое поле обеспечивает улучшенное описание конформационной гибкости белка, что принципиально важно для анализа поведения N-концевого домена EсоСАγ, и в то же время имеет корректную параметризацию липидов.

Модель гомотримера центрировали в периодической прямоугольной ячейке с расстоянием от поверхности белка до границ не менее 12 Å. Водную среду моделировали с применением модели TIP3P. Протонирование аминокислотных остатков задавали стандартным образом: кислотные остатки моделировали в депротонированной форме (заряд -1), основные — в протонированной (заряд +1). Остатки, координирующие каталитический ион Zn^{2+} (His67, His70, His91, His96),

моделировали в депротонированных состояниях для обеспечения корректной геометрии координации и исключения искусственного электростатического отталкивания с ионом металла.

Поскольку точные данные о субклеточной локализации и ориентации EсoCАγ относительно мембраны к моменту проведения работы отсутствовали, мембранную систему формировали с использованием модели, отражающей состав внутреннего листка внешней мембраны грамотрицательных бактерий: PE:PG:CL = 75:20:5. Такой выбор рассматривался как обоснованный рабочий контекст для анализа мембранной ассоциации и допускает уточнение при появлении новых экспериментальных данных. Для водной системы ионную силу задавали 300 мМ (Na⁺/Cl⁻) при рН 7,5, воспроизводя условия, описанные в работе по EсoCАγ [127]. Полный состав обеих систем приведён в Таблице 5.

Таблица 5. Состав систем молекулярно-динамических расчётов EсoCАγ. Соотношения липидов соответствуют внутреннему слою внешней мембраны грамотрицательных бактерий (PE:PG:CL = 75:20:5).

Наименование компонента	Кол-во молекул	Примечание
Водная система (белок в имитации буферных условий)		
PROA	1	
PROB	1	
PROC	1	
ZN2	3	
SOD	707	
CLA	716	
TIP3	247740	
Мембранная система (белок погружен в липидный бислой)		
PROA	1	
PROB	1	
PROC	1	
ZN2	3	
PMPG	328	PG (20%)
PMPE	1230	PE (75%)
PVCL2	82	CL (5%)
SOD	1254	
CLA	1005	
TIP3	361468	

Минимизацию энергии системы проводили методом наискорейшего спуска до достижения градиента энергии менее 500 кДж/моль. Уравновешивание водной системы включало 1 нс в ансамбле NVT, затем 1 нс в ансамбле NPT. Для мембранной системы проводили три цикла NVT по 1 нс (итого 3 нс) и три цикла NPT по 1 нс (итого 3 нс) с постепенным снятием позиционных ограничений на белок и липидные компоненты. Качество уравновешивания мембранной системы оценивали по временной стабильности температуры, плотности и размеров расчётной ячейки (X/Y), а для мембранной системы дополнительно по площади на липид (APL) и толщине бислоя (P–P distance). Параметры уравновешивания молекулярно-динамических симуляций EсoCAγ в водной среде и мембранном окружении представлены в Таблице 6.

Таблица 6. Параметры уравновешивания систем молекулярно-динамических расчётов EсoCAγ.

Параметр	Интервал траектории	Среднее $\pm$ SD	Примечания
Водная система (белок в имитации буферных условий)			
Температура (К)	500–1000 пс	310.03 $\pm$ 0.38	2 группы (гомотример /растворитель)
Плотность (кг·м ⁻³)	500–1000 пс	1018.07 $\pm$ 0.61	Стабильно
Размер ячейки (нм) (Box-X; Box-Y; Box-Z)	500–1000 пс	19.5627 $\pm$ 0.0037	Стабильно
Давление (бар, x/y/z)	500–1000 пс	1.02 $\pm$ 0.13	Полуизотропный баростат Parrinello–Rahman.
Мембранная система (белок погружен в липидный бислой)			
Температура (К)	последняя 1 нс	310.05 $\pm$ 0.33	3 группы (гомотример /мембрана/растворитель)
Плотность (кг·м ⁻³)	последняя 1 нс	1010.18 $\pm$ 0.46	Стабильна
Размер ячейки (нм) (Box-X; Box-Y)	последняя 1 нс	22.925 $\pm$ 0.010	Симметричные размеры в плоскости мембраны
Размер ячейки (нм) (Box-Z)	последняя 1 нс	24.610 $\pm$ 0.020	

Давление (бар, ху/z)	последняя 1 нс	1.03 ± 0.10	Компоненты ху и z; полуизотропное сопряжение
Площадь на липид (нм ² /липид)	последняя 1 нс	0.641 ± 0.001	Lx·Ly / N_лист
Толщина бислоя, Р–Р (нм)	последняя 1 нс	3.881 ± 0.006	Расстояние между центрами масс фосфатных групп листов

Длительные траектории симуляции выполняли в ансамбле NPT при температуре 310 К и давлении 1 бар. Длительность симуляции составляла 50 нс для системы в растворе и 100 нс для мембранной системы, временной шаг интегрирования — 2 фс. Дальнодействующие электростатические взаимодействия учитывали методом суммирования по Эвальду (PME) с отсечкой 1.2 нм (12 Å). Температуру поддерживали термостатом V-rescale (две группы сопряжения для водной системы и три — для мембранной), давление — баростатом Parrinello–Rahman (изотропное сопряжение для системы в растворе и полуизотропное — для мембранной системы).

2.5.4. Анализ траекторий молекулярной динамики и визуализация результатов

Анализ МД-траекторий проводили с использованием стандартных структурно-динамических метрик. Основным критерием устойчивости симуляции считали среднеквадратичное отклонение (RMSD), отражающее среднее изменение положения атомов относительно стартовой геометрии. RMSD рассчитывали по всем кадрам траектории по формуле:

$$\text{RMSD}_x = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\mathbf{r}'_i(t_x) - \mathbf{r}_i(t_{\text{ref}}))^2}, \quad (2-1)$$

где N — число атомов, t_{ref} — референсный момент времени (как правило, первый кадр анализируемого участка траектории), $\mathbf{r}'_i(t_x)$ — координаты i -го атома в x -м кадре, $\mathbf{r}_i(t_{\text{ref}})$ — координаты i -го атома в референсном кадре.

Для оценки локальной подвижности аминокислотных остатков рассчитывали среднеквадратичную флуктуацию (RMSF) для каждого остатка:

$$\text{RMSF}_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum \langle (\mathbf{r}'_i(t_x) - \mathbf{r}_i(t_{\text{ref}}))^2 \rangle}, \quad (2-3)$$

где T — длительность анализируемого временного интервала, t_{ref} — референсный кадр, $\mathbf{r}_i$ — координаты атомов i -го остатка.

Анализ траекторий молекулярной динамики проводили отдельно для каждой группы систем в соответствии с использованными пакетами моделирования.

Для систем β -CA mtCA2 и EcoCA γ анализ выполняли в GROMACS 2023.2. Рассчитывали RMSD (gmx rms), RMSF (gmx rmsf), радиус гирации (gmx gyrate), площадь поверхности, доступной растворителю, SASA (gmx sasa), а также межатомные расстояния (gmx distance). В случае EcoCA γ для получения репрезентативных конформаций выполняли кластеризацию траекторий методом GROMOS. Кластеризацию кадров траектории методом GROMOS, начинали с участка после уравнивания системы (момент уравнивания определяли по выходу RMSD на плато) с последующим отбором репрезентативных структур в соответствии с применённой методологией [187]. Для каждой траектории индивидуально подбирали порог кластеризации (RMSD-предел) путём построения кривых зависимости числа кластеров от величины порога. Оптимальный порог выбирали на основе установленных критериев [187]: общее число кластеров не должно превышать 40; не менее 90 % кадров траектории должны распределяться не более чем по семи кластерам; число кластеров, содержащих лишь одну структуру, должно быть минимальным. Такой подход обеспечивает репрезентативность выборки при сохранении информативности кластеризации.

Для систем β -CA mtCA2 расстояния в активном центре вычисляли модулем `gmx mindist` как минимальное расстояние между тяжёлыми атомами соответствующих групп, отдельно для каждого активного центра каждого повтора: для Cys51 и Cys107 — до атома SG, для His104 — до NE2, для Asp53 — до ближайшего из карбоксилатных кислородов OD1 и OD2. Расстояние Asp53–Arg55 измеряли между теми же карбоксилатными кислородами Asp53 и гуанидиниевыми азотами Arg55 (NE, NH1, NH2). Солевой мостик считали замкнутым при значении не более 0,4 нм.

Межсубъединичные интерфейсы β -CA mtCA2 характеризовали четырьмя величинами: числом межсубъединичных контактов, площадью поверхности, экранированной от растворителя (BSA), расстоянием между центрами масс субъединиц и углом между их главными осями инерции. Тетрамер mtCA2 образует два типа интерфейсов: внутридимерный и димер-димерный, остатки каждого интерфейса определяли по первому кадру длительного запуска. К интерфейсу относили те остатки, у которых хотя бы один тяжёлый атом находился в пределах 0,45 нм от соседней субъединицы (Приложение А, таблица П1). Межсубъединичным контактом считали пару тяжёлых атомов из разных цепей в пределах 0,45 нм. BSA вычисляли как разность между суммой площадей изолированных цепей и площадью пары с шагом отбора 100 пс (`gmx sasa`). Расстояние между центрами масс субъединиц определяли модулем `gmx distance`, а угол между главной осью инерции модулем `gmx principal`.

Визуализацию структур и траекторий проводили в PyMOL, построение графиков — с использованием библиотек NumPy 1.24.3, Matplotlib 3.7.2 и MD-DaVis [186]. Сопоставление экспериментальных и модельных структур осуществляли в Coot (версия 0.9.8.92) и PyMOL.

Для систем α -CA II с ингибиторами 8V8 и 8V5 анализ траекторий выполняли 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). Для анализа поведения ингибиторов в сайте связывания α -СА II отслеживали межмолекулярные контакты «белок–лиганд» в течение траектории, включая водородные связи, гидрофобные контакты, ионные (солевые) взаимодействия и контакты, опосредованные водой. При построении гистограмм учитывали все типы контактов на протяжении всей траектории, включая множественные взаимодействия одного и того же атома лиганда с атомными группами конкретного аминокислотного остатка. Критерии регистрации водородных связей «белок-лиганд» задавали как расстояние между атомами в $2.5 \text{ \AA}$ ($D - H \cdots A$, где D – донор, A – акцептор), валентный угол $D - H \cdots A \geq 120^\circ$, а $H \cdots A - X \geq 90^\circ$. Гидрофобные контакты, включая $\pi - \pi$ стекинг и π -катион взаимодействия, учитывали на расстояниях до $4.5 \text{ \AA}$, а неспецифические контакты с гидрофобными остатками — при расстоянии не более $3.6 \text{ \AA}$. Ионные взаимодействия регистрировали между заряженными группами при расстоянии $3.7 \text{ \AA}$ при условии отсутствия водородных связей. Для контактов, опосредованных водой, использовали критерии: $D - H \cdots A = 2.8 \text{ \AA}$, валентный угол $D - H \cdots A = 110^\circ$, а $H \cdots A - X = 90^\circ$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Разработка системы критериев для приоритизации карбоангидраз как терапевтических мишеней

На основе анализа современных подходов к оценке молекулярных мишеней и специфических особенностей семейства карбоангидраз в настоящей работе была разработана система критериев, предназначенная для комплексной оценки карбоангидраз как потенциальных терапевтических мишеней.

Предложенная система позволяет рассматривать карбоангидразы в рамках единой схемы анализа, объединяющей биологические, биохимические, структурные и прикладные аспекты исследования. При этом система предназначена не только для сопоставления различных изоформ, но и для выявления ограничений, препятствующих их дальнейшему изучению и практическому использованию.

Система включает шесть взаимосвязанных критериев, объединённых в четыре последовательные фазы: биологическую, биохимико-структурную, фенотипическую и терапевтическую (подробное описание критериев приведено в разделе 2.2). Каждая последующая фаза основывается на результатах предыдущего этапа и определяет степень достоверности полученных данных. Вместе с тем система допускает применение при различной полноте экспериментального материала и может использоваться как при наличии детальной структурной информации, так и в условиях ограниченных данных.

В зависимости от характера исследуемого объекта система может использоваться для последовательного анализа накопленных данных, выявления противоречий между различными этапами исследования или построения структурно и функционально обоснованных гипотез (Рисунок 12). Таким образом, предложенный подход задаёт общую логику интерпретации результатов при исследовании карбоангидраз различных классов.

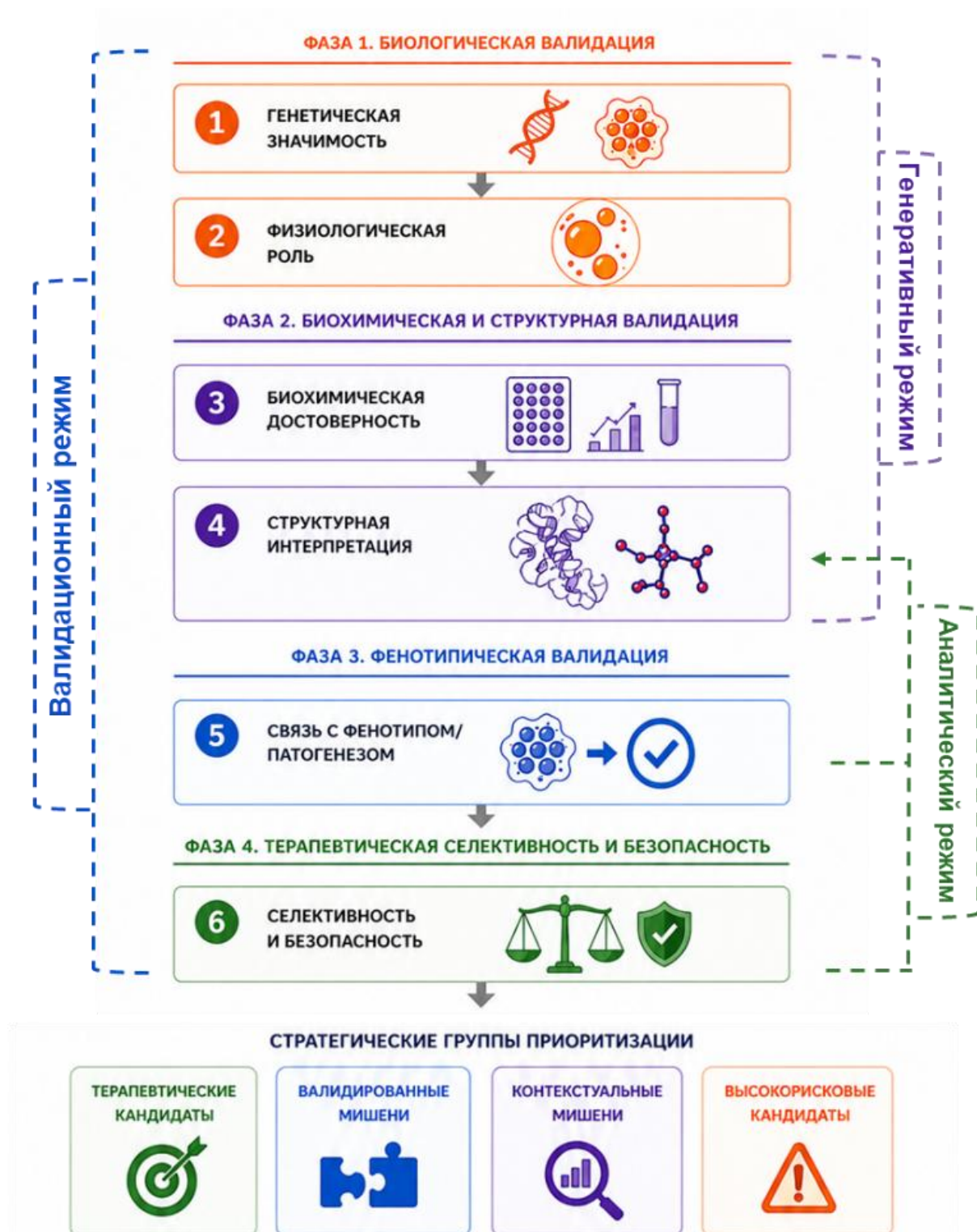


Рисунок 12. Схематическая иллюстрация системы валидации карбоангидраз, включающей шесть критериев и их распределение по фазам. Пунктирными линиями показано соответствие критериев различным режимам применения системы. В нижней части схемы представлены стратегические группы приоритизации изоформ.

3.1.1. Структура и логика системы валидации

Первая фаза включает критерии генетической значимости и физиологической роли изоформы. На данном этапе оценивают, связана ли активность целевой изоформы с физиологически значимыми процессами и может ли её функция компенсироваться другими изоформами. Для бактериальных карбоангидраз данный этап имеет принципиальное значение, поскольку наличие ферментативной активности само по себе ещё не подтверждает значимость фермента в условиях инфекции.

Затем идет самая объемная фаза, которая объединяет критерии достоверности биохимических и интерпретации структурных данных. Её задача, оценить, в какой мере имеющиеся данные отражают реальное состояние фермента в клетке.

Биохимический критерий предполагает анализ обоснованности условий, в которых получены результаты *in vitro*. Вместе с тем анализируются конструкции, применявшиеся при работе с белком: наличие водорастворимых пептидов или иных меток, аминокислотных замен или дополнительных доменов. Всё это искажает наблюдаемые результаты. Поэтому в рамках данной системы, имеет значение не столько наличие данных, сколько их соответствие физиологическому оптимуму изоформы.

Аналогичная логика применима и к структурному критерию: ключевым является не сам факт наличия или отсутствия экспериментальной структуры, а полнота её анализа. Для установления молекулярных основ селективности необходимо применять несколько взаимодополняющих подходов. Сравнение структур апо-форм и комплексов позволяет оценить, как связывание лиганда изменяет окружение активного центра. Анализ белок-лигандного комплекса в целом, а не только области связывания, даёт возможность охарактеризовать стерическое соответствие лиганда и белка. Наконец, повторный анализ и переуточнение депонированных структур нередко меняют принципиальные выводы о механизме связывания.

Отдельную роль в этой фазе играет биоинформатический анализ. Он служит дополнением экспериментальных данных и снимает вопрос возможных ограничений самого эксперимента. Опираясь на возможности силового поля, мы можем работать как с уже выдвинутыми гипотезами, так и формулировать свои. Всё это доступно в рамках молекулярно-механического приближения и требует согласованности независимых расчётов, чтобы обосновать постановку следующего эксперимента. Комбинирование различных подходов дает согласованную картину, в которой структура, динамика и функция переходят в единое целое. Именно это делает вторую фазу краеугольной для понимания механизма работы фермента и дизайна селективных ингибиторов.

Переход от характеристики изоформы как белка к её оценке как мишени происходит в третьей фазе. Здесь устанавливается связь между подавлением активности фермента и эффектом для клетки или организма. Для бактериальных изоформ это снижение жизнеспособности, потеря факторов вирулентности, утрата адаптационных свойств. У человека это подтверждается согласованностью с патогенезом заболевания. Без этого этапа любая биохимическая характеристика остаётся характеристикой белка, а не мишени.

Завершающим этапом становится оценка селективности ингибиторов с учётом возможного эффекта на карбоангидразы хозяина и комменсальной микробиоты. Именно здесь определяется практическое использование исследуемой изоформы в качестве терапевтической мишени.

Предложенная система построена поэтапно: каждая последующая фаза определяет степень достоверности дальнейшей интерпретации результатов. При этом ограничения, выявленные на отдельных этапах, не исключают изоформу из анализа, а позволяют определить характер нерешённых вопросов и направление дальнейших исследований. По совокупности выполненных критериев изоформа относится к одной из четырёх групп приоритетности (Таблица 7).

Изоформы, которые не удовлетворяют первым двум критериям, относятся к группе высокорисковых мишеней. Для таких объектов характерны отсутствие

подтверждённой роли в условиях инфекции либо возможность функциональной компенсации другими карбоангидразами.

Ограничения на второй фазе позволяют рассматривать изоформу как контекстуальную мишень. В эту группу относятся ферменты, для которых отсутствуют экспериментальные структуры, наблюдаются противоречия в данных о ферментативной активности или сохраняется несоответствие между рН-оптимумом эксперимента и предполагаемыми условиями функционирования фермента в клетке.

В случае если основным ограничением остаётся обеспечение достаточной селективности действия ингибиторов, то фермент классифицируется, как валидированная мишень. При прохождении всех шести критериев, изоформу рассматривают как терапевтическую мишень.

Таблица 7. Классификация изоформ по приоритетности

Группы приоритетности	Условия присвоения	Ключевые ограничения
Группа А Терапевтический кандидат	Удовлетворяют критериям 1–6	Не выявлены
Группа В Валидированная мишень	Удовлетворяют критериям 1–5	Требуется обеспечение достаточной селективности действия ингибиторов
Группа С Контекстуальная мишень	Удовлетворяют критериям 1–2; ограничения по критериям 3–4	Отсутствие структуры; неполные биохимические данные; несоответствие рН <i>in vitro</i> условиям функционирования <i>in vivo</i>
Группа D Высокорисковая мишень	Ограничения по критериям 1–2	Неэссенциальность; функциональная компенсация; неясная физиологическая роль

3.1.2. Применение системы к различным классам карбоангидраз

Разработанная система использовалась как общий подход для оценки карбоангидраз различных классов, однако характер её применения зависел прежде всего от степени изученности класса. В одних случаях основной задачей становилась интерпретация уже накопленных структурных данных, тогда как в других система применялась для выявления противоречий между отдельными этапами исследования или для формулирования новых функциональных гипотез. Поэтому система реализуется в трёх разных режимах — аналитическом, валидационном и генеративном.

Аналитический режим использовался при исследовании α -СА. Поскольку физиологическая роль α -СА человека подробно изучена, ключевое значение приобретает интерпретация структурных особенностей белок-лигандных взаимодействий, определяющих сродство и селективность соединений. Валидационный подход реализуется при анализе β -СА, где система используется для последовательной проверки всех критериев. Это дает возможность выявлять разрывы между отдельными уровнями доказательной базы и на этом основании классифицировать каждую изоформу по группам приоритетности (Таблица 8). Иная ситуация наблюдается в случае γ -СА, где объём экспериментальных данных остаётся неполным. Поэтому большая часть анализа опирается на биоинформатические методы, что позволяет в подобных условиях формулировать функционально и структурно обоснованные гипотезы (генеративный режим), пригодные для дальнейшей экспериментальной проверки.

Таким образом, единая система критериев позволяет проводить системный анализ карбоангидраз различных классов независимо от степени их изученности.

Таблица 8. Режимы работы системы валидации на примере α -, β - и γ -СА.

Класс СА	Режим системы	Результат
α -СА	Аналитический	Интерпретация структурных данных и механизмов связывания
β -СА	Валидационный	Выявление пробелов между отдельными этапами исследования и классификация по группам приоритетности (Таблица 7)
γ -СА	Генеративный	Формирование функциональных гипотез при ограниченной экспериментальной базе

3.1.3. Значение разработанного подхода

Применение системы позволяет перейти от описания отдельных свойств карбоангидраз к системной оценке изоформ как мишеней для ингибиторов. Единые критерии делают анализ более последовательным, что позволяет соотносить конкретное ограничение к определенному этапу валидации мишени.

Одним из преимуществ предложенного подхода является прозрачность интерпретации полученных данных. Система позволяет отдельно оценивать, какие свойства конкретной изоформы подтверждены экспериментально, а какие остаются на уровне предположений и требуют дополнительной валидации. Дополнительно, такая схема задаёт последовательность исследования изоформы и позволяет более обоснованно подходить к постановке последующих экспериментов. Это особенно важно при исследовании карбоангидраз, у которых структурные, биохимические и физиологические данные нередко разобщены. В следующих разделах представлено применение разработанной системы к α -, β - и γ -СА. Это позволяет продемонстрировать возможность её использования в различных типах исследовательских задач.

3.2. ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ К α -КЛАССУ

α -СА II была использована для демонстрации аналитического режима применения разработанной системы. В отличие от β - и γ -СА, для α -СА II к настоящему времени накоплен значительный объём структурных и биохимических данных, а клиническая значимость данной изоформы подтверждена многолетним использованием ингибиторов карбоангидраз в терапии глаукомы и других заболеваний. В связи с этим основная задача исследования заключалась не в установлении физиологической роли фермента, а в анализе молекулярных механизмов взаимодействия α -СА II с высокоактивными ингибиторами.

В рамках разработанной системы данная задача соответствует этапу структурной интерпретации. На этом уровне принципиальное значение имеет не только наличие кристаллической структуры комплекса, но и возможность объяснить вклад отдельных фрагментов лиганда в формирование сродства к ферменту, чувствительности изоформ к соединению и устойчивости белок-лигандного комплекса. Особенно это важно для соединений, обладающих активностью в пикомолярном диапазоне, но не имеющих однозначной структурной интерпретации механизма взаимодействия с ферментом.

В качестве объектов исследования были выбраны два отечественных сульфонамидных ингибитора α -СА II — 8V8 и 8V5, для которых ранее были показаны пикомолярные значения констант ингибирования (K_i 0,05 нМ и 0,02 нМ соответственно) (Рисунок 5, раздел 1.2.2) [55]. Несмотря на наличие опубликованных кристаллических структур комплексов α -hCA II с данными соединениями, структурные основы их высокой активности и различий в чувствительности отдельных изоформ к ингибиторам оставались изучены неполно. Это связано как с особенностями самих кристаллических структур, так и с неполнотой анализа белок-лигандных взаимодействий в опубликованных работах.

Наиболее существенное ограничение было связано со структурой комплекса α -hCA II с соединением 8V5, для которой отсутствовала интерпретируемая

электронная плотность морфолинового фрагмента лиганда, что не позволяло надёжно определить положение дистального фрагмента ингибитора в активном центре и оценить его вклад в стабилизацию комплекса.

Для решения данного ограничения в работе были использованы несколько взаимодополняющих подходов, соответствующих аналитическому режиму применения системы: получение структур комплексов с использованием гомологичной модельной системы, сравнительный анализ комплексов α -СА II человека с ингибиторами 8V8 и 8V5, опубликованных в 2017 году [55], сопоставление структур комплексов с апо-формами фермента, а также молекулярно-динамические расчёты для оценки устойчивости выявленных взаимодействий.

В качестве гомологичной модельной системы была выбрана α -СА II быка, характеризующаяся высокой степенью сходства с α -СА II человека и сохранением архитектуры активного центра (Рисунок 6, раздел 1.2.2). Использование данной модели позволило получить структуры комплексов α -bСА II с соединениями 8V8 и 8V5 с разрешением 1,50 и 1,70 Å соответственно и провести более детальный анализ положения ингибиторов в активном центре фермента.

3.2.1. Получение и очистка α -bСА II

Для получения рекомбинантной α -bСА II использовали штамм *E. coli* BL21(DE3)pLacRARE, трансформированный плазмидой pET11с, содержащей полноразмерный ген *α -bCA2* под контролем T7-промотора. Плазида была ранее сконструирована и получена Анатолием Глуховым (Институт белка, РАН).

Экспрессию гена индуцировали добавлением ИПТГ (0,5 мМ) при достижении культурой оптической плотности OD₆₀₀ ~0,6 (Рисунок 13). Для обеспечения корректной инкорпорации каталитического иона Zn²⁺ в среду одновременно добавляли ZnSO₄ (0,5 мМ). После индукции клетки инкубировали при 18 °С в течение 16 часов, после чего осаждали центрифугированием.

Подробные условия препаративной наработки белка описаны в главе «Объекты и методы исследований» (2.3). Полученную клеточную массу использовали для дальнейшего выделения и очистки белка.

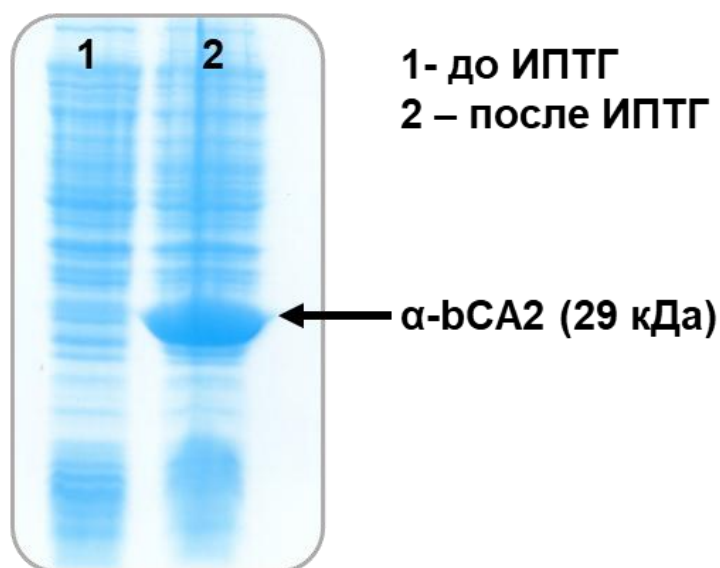
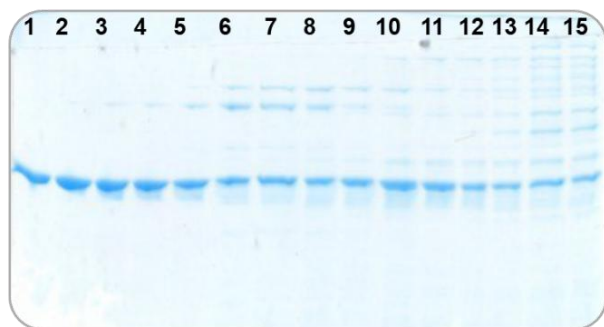


Рисунок 13. Анализ экспрессии гена α -bCA2 методом электрофореза в 12% ПААГ в денатурирующих условиях. Дорожка 1 — до индукции; Дорожка 2 — после индукции ИПТГ (0,5 мМ). Стрелкой указана интенсивная полоса, соответствующая рекомбинантному белку α -bCA II (29 кДа).

Очистку рекомбинантной α -bCA II проводили с использованием комбинации методов колоночной хроматографии, подбор которых определялся данными об аминокислотном составе, изоэлектрической точке и молекулярной массе белка. С учётом значительного содержания гидрофобных аминокислотных остатков в последовательности белка в качестве первого этапа очистки была выбрана гидрофобная хроматография на носителе Butyl-Sepharose. Перед нанесением образца к супернатанту добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1,7 М, что обеспечивало эффективное связывание белка с носителем. Элюцию проводили градиентным снижением концентрации соли.

Фракции после гидрофобной хроматографии



Фракции после гель-фильтрации

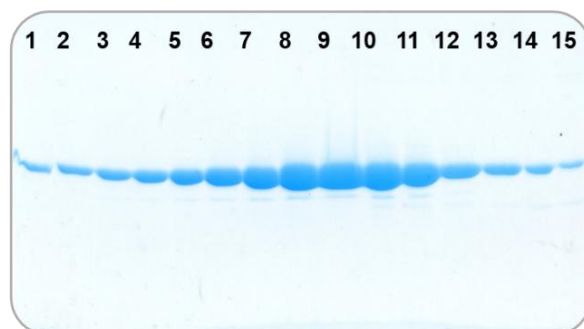


Рисунок 14. Анализ фракций рекомбинантной α -bCA II на этапах очистки методом электрофореза в 12% ПААГ в денатурирующих условиях. Слева — анализ фракций, полученных после гидрофобной хроматографии на колонке Butyl-Sepharose. Справа — анализ фракций после очистки методом гель-фильтрации на колонке Superdex G75: дорожки 1–15 соответствуют последовательным фракциям элюции. Полученные данные свидетельствуют об эффективном удалении примесей и получении препарата α -bCA II высокой степени чистоты, пригодного для кристаллизации.

Фракции, полученные после гидрофобной хроматографии, анализировали спектрофотометрически и методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН (Рисунок 14). Фракции, содержащие целевой белок, объединяли, концентрировали и дополнительно очищали методом гель-фильтрации на колонке Superdex G75. Данный этап позволил удалить остаточные примеси и получить препарат α -bCA II с чистотой, достаточной для постановки кристаллизационных экспериментов (Рисунок 14,15).

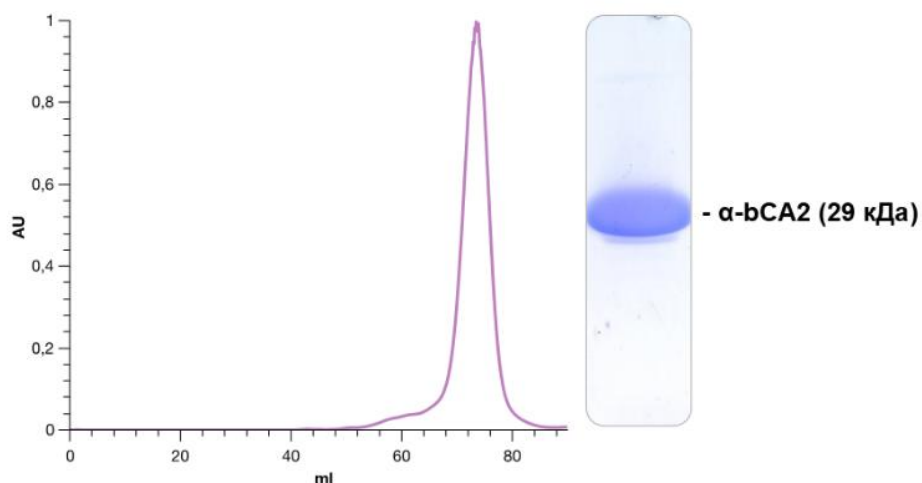


Рисунок 15. Профиль элюции α -bCA II и анализ чистоты (ДСН-ПААГ, 12%; нагрузка 40 мкг).

3.2.2. Кристаллизация α -bCA II и получение кристаллов комплексов с ингибиторами

Кристаллизацию α -bCA II и получение комплексов с ингибиторами проводили в условиях, описанных в разделе 2.3.2.4. В результате были получены кристаллы комплексов с ингибиторами 8V5 и 8V8, пригодные для рентгеноструктурного анализа (Рисунок 16).

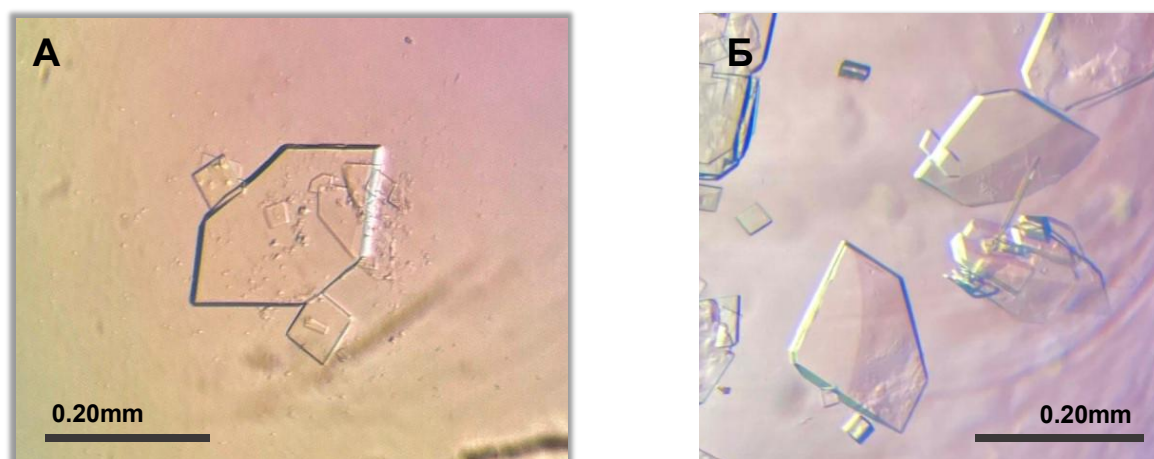


Рисунок 16. Кристаллы α -bCA II в комплексе с ингибиторами 8V8 (А) и 8V5 (Б).

3.2.3. Определение структур комплексов α -bCA II с ингибиторами 8V5 и 8V8

Дифракционные данные собирали при 100 K на лабораторной рентгеновской установке Rigaku XtaLAB Synergy-S. Обработку данных проводили с использованием пакета CrysAlisPro. Характеристика наборов дифракционных данных представлена в Таблице 9. Пространственные структуры комплексов определяли методом молекулярного замещения с использованием структуры α -bCA II (PDB ID: 1V9E). Уточнение структур выполняли в программах REFMAC5 и Phenix. Статистика уточнения представлена в Таблице 8. Структуры комплексов α -bCA II 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) [161]. В обеих структурах наблюдалась чёткая электронная плотность для молекул лигандов. Для комплекса с 8V5 впервые получена непрерывная электронная плотность по всей длине лиганда, включая морфолиновый фрагмент, что позволило впервые описать его положение в активном центре и оценить вклад в стабилизацию комплекса.

Таблица 9. Статистика сбора дифракционных данных и уточнения структур α -bCA II в комплексе с лигандами 8V8 (PDB ID: 23ON) и 8V5 (PDB ID: 23OM).

PDB ID	23ON (α-bCA II •8V8)	23OM (α-bCA II •8V5)
Диапазон 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 рефлексов	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)
Среднеквадратичное отклонение длин связей (Å)	0.006	0.007
Среднеквадратичное отклонение валентных углов (°)	0.89	0.93
Предпочтительные области диаграммы Рамачандрана (%)	96.67	95.51
Допустимые области (%)	3.53	4.30
Недопустимые области (%)	0.00	0.00
Неоптимальные ротамеры (%)	1.74	0.44

3.2.4. Структурный анализ связывания 8V8

Способ связывания 8V8 в активном центре α -bCA II воспроизводит ранее описанный для α -hCA II (PDB ID: 5NEA). Атом азота сульфонамидной группы координирует ион цинка и выступает донором водородной связи с О γ остатка Thr199; атом кислорода той же группы выступает акцептором водородной связи с амидной группой остова Thr199. Бензольное кольцо участвует в гидрофобных взаимодействиях с Val121 и Leu198. Оксазольный фрагмент прямых контактов с белком не образует. Хвостовая метильная группа ориентирована в сторону Pro202 ($\sim 4,5$ Å) (Рисунок 17).

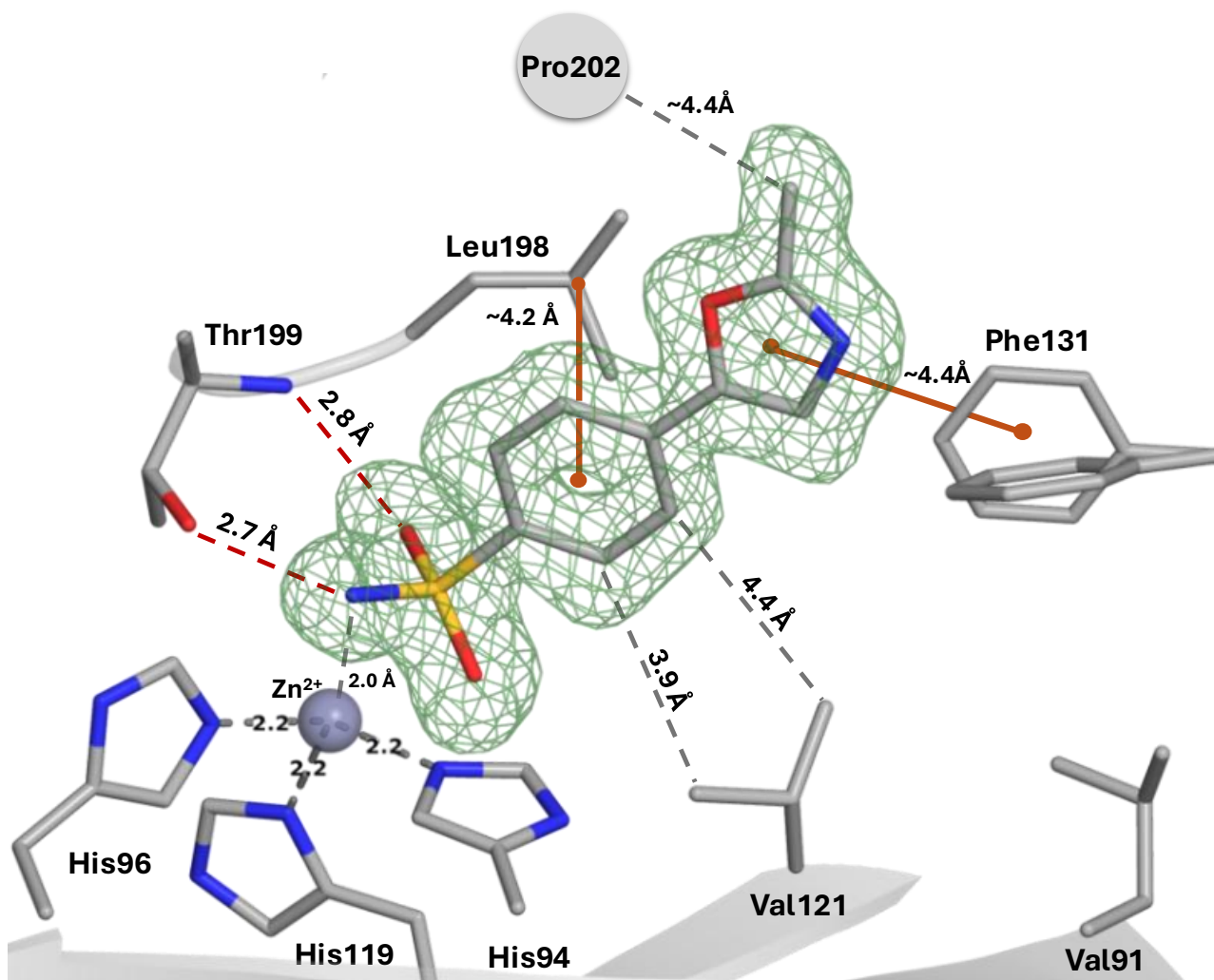


Рисунок 17. Активный центр α -bCA II в комплексе с 8V8. Электронная плотность (polder mFo–DFc, 3σ) показана зеленой сеткой. Ключевые аминокислотные остатки активного центра показаны в стержневой модели. Ион цинка показан сферой..

В структуре α -bCA II наблюдается смещение метильного фрагмента ($\sim 1,2$ Å) относительно α -hCA II, что обусловлено заменой Ile91Val. В α -hCA II объёмная боковая группа Ile91 смещает метильную группу в сторону Pro202, тогда как в α -bCA II аналогичная ориентация стабилизируется ротамером Phe131 (Рисунок 18).

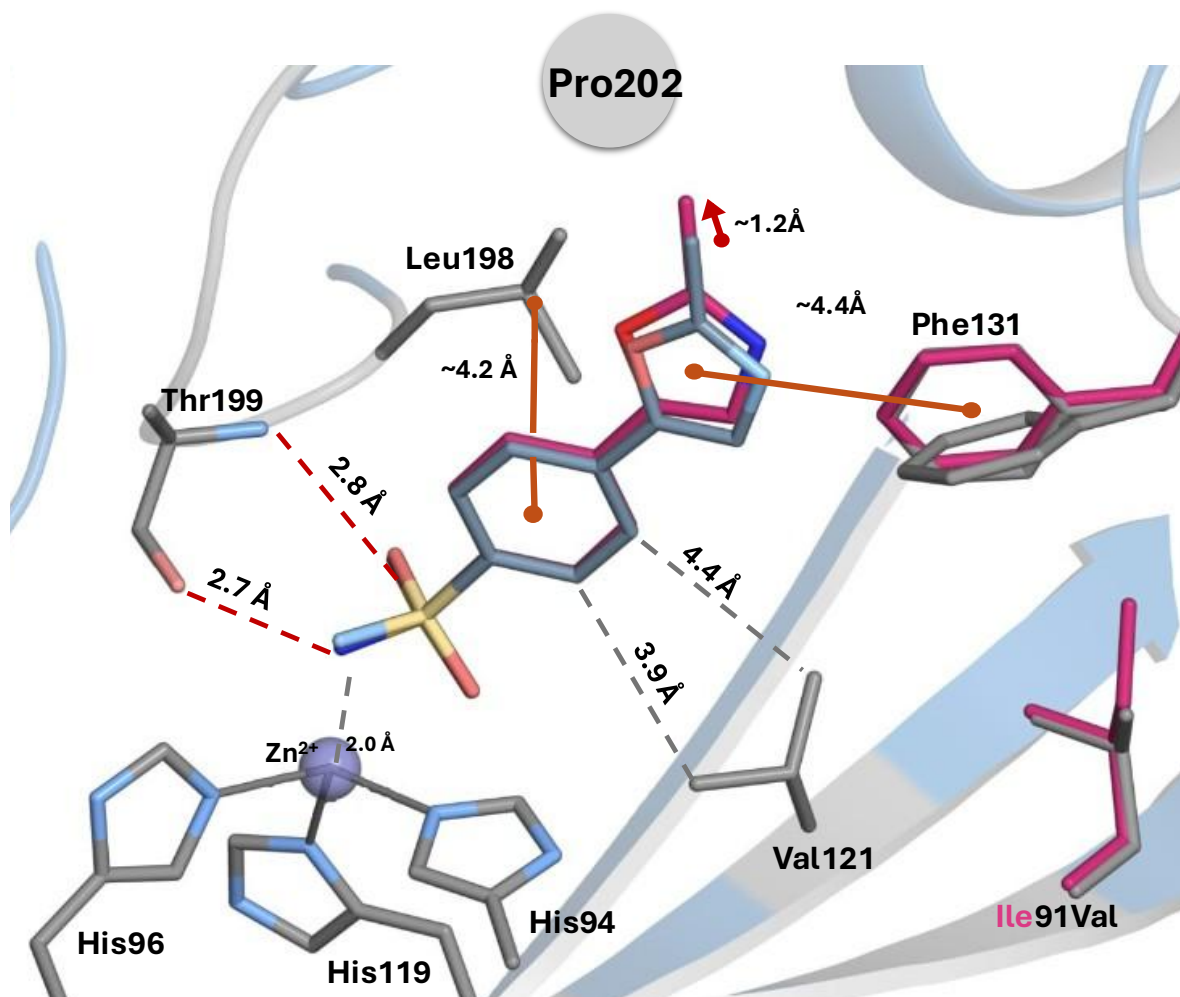


Рисунок 18. Наложение структур комплексов α -bCA II (серый) и α -hCA II (розовый; PDB: 5NEA) с лигандами 8V8. Ион цинка показан серой сферой. Ключевые аминокислотные остатки активного центра показаны в стержневой модели. Водородные связи показаны красной пунктирной линией.

Сохранение положения лиганда в активном центре при указанных заменах свидетельствует о единственном механизме связывания и позволяет рассматривать α -bCA II как правомерную гомологичную модель.

Влияние связывания ингибитора на конформацию активного центра α -CA II оценивали путём сравнения кристаллических структур комплексов (PDB ID: 5NEA — α -hCA II•8V5; 23ON — α -bCA II•8V5) с апо-формами α -hCA (3KS3) и α -bCA (1V9E). При связывании лиганда в активном центре происходит десольватация и компактизация боковых групп аминокислотных остатков гидрофобного кластера. Высокое сродство 8V8 к α -CA 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».

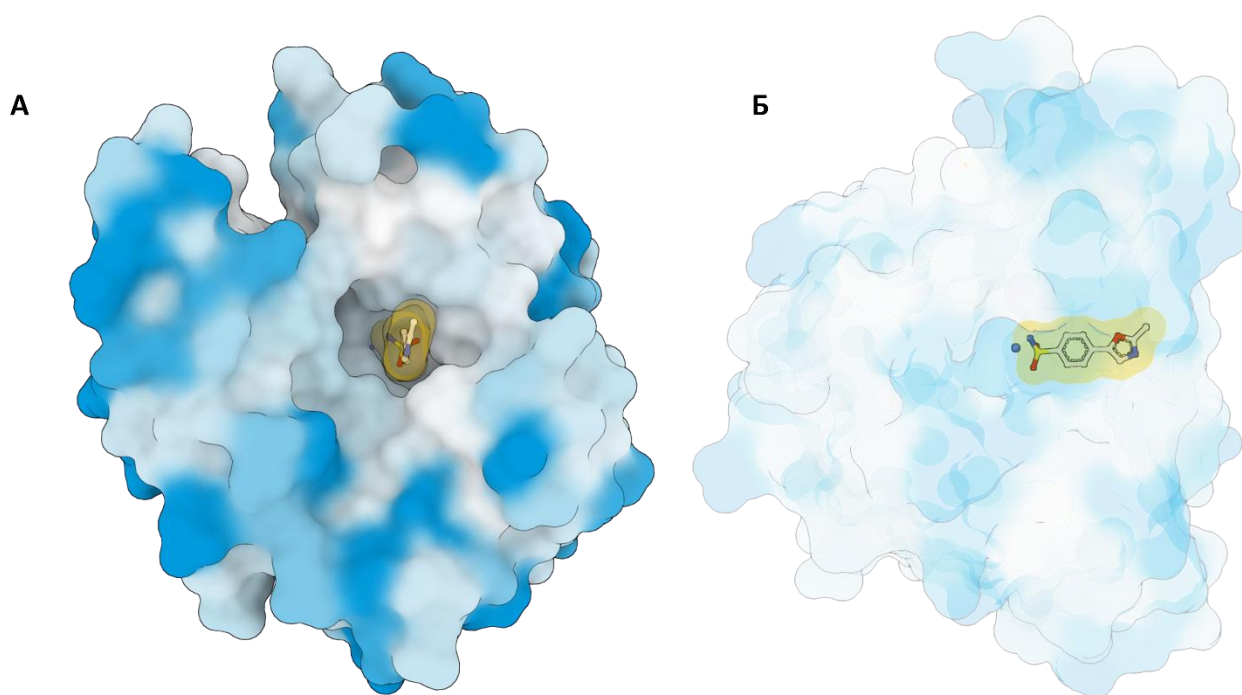


Рисунок 19. Схема взаимодействия белка и лиганда 8V8 по типу «ключ–замок». (А): поверхность α -bCA II в комплексе с 8V8, окрашенная градиентом по гидрофобности, где синий – полярные остатки, белый – гидрофобные. (Б): срезка той же структуры в повороте на 90°.

3.2.5. Структурный анализ связывания 8V5

В структуре α -bCA II•8V5 впервые получена непрерывная электронная плотность вдоль всей молекулы лиганда, в том числе в области морфолинового фрагмента. Это позволило установить положение дистальной части молекулы и оценить вклад морфолинового кольца в связывание. Наряду с координационными взаимодействиями сульфонамидной группы с ионом Zn^{2+} и остатком Thr199 и гидрофобными контактами тиафенового кольца с Leu198 обнаружены дополнительные взаимодействия: атом кислорода боковой цепи Gln92 образует бифуркационную водородную связь с атомом кислорода оксазольного кольца и карбоксильной группой лиганда; морфолиновый фрагмент участвует в СН– π /диполь– π -взаимодействии с Phe131 (Рисунок 20).

Сравнение структур комплексов α -hCA II•8V5 (5NEE) и α -bCA II•8V5 (23OM) с апо-формами α -hCA II (3KS3) и α -bCA II (1V9E) показало, что связывание 8V5, как и 8V8, сопровождается десольватацией активного центра. В рассматриваемом случае потери компенсируются формированием новых водородных связей, гидрофобных контактов и СН– π /диполь– π -взаимодействия морфолинового фрагмента с Phe131. 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.

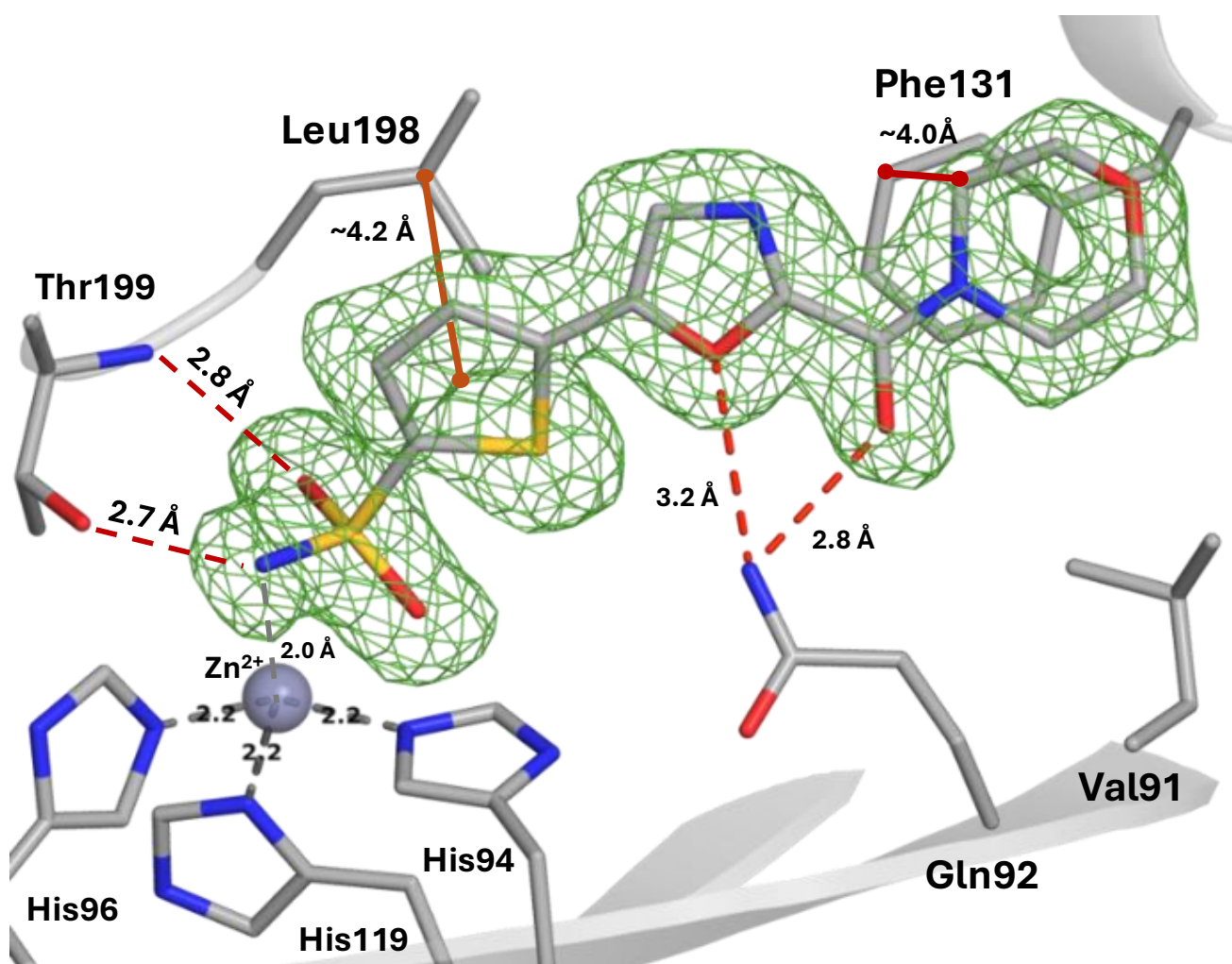


Рисунок 20. Активный центр α -bCA II в комплексе с 8V5. Электронная плотность (polder $mF_o - DF_c$, 3σ) показана зеленой сеткой. Ион цинка показан серой сферой. Ключевые аминокислотные остатки активного центра показаны в стержневой модели. Водородные связи показаны красной пунктирной линией.

3.2.6. Анализ и переуточнение структуры комплекса α -hCA II•8V5 (PDB ID: 5NEE)

Сравнение структуры α -bCA II•8V5 со структурой α -hCA II•8V5 (5NEE) обнаружило несоответствия как в положении лиганда, так и в ориентации боковых групп остатков активного центра, включая Phe131, что послужило основанием для повторного уточнения структуры 5NEE. Уточнение выполнялось в программах COOT и PHENIX с применением исходных координат и структурных факторов. Последовательно устранялись артефакты модели белка, уточнялись позиции

молекул растворителя; положение лиганда определялось по картам 2Fo–Fc, Fo–Fc и omit-картам с исключением лиганда. Непрерывная плотность выявлена лишь для проксимальной части молекулы — сульфонамидной группы и тиюфен-оксазольного фрагмента; для морфолинового участка плотность отсутствовала на всех типах карт. Включение полной модели лиганда или модели с частичной заселённостью порождало выраженную разностную плотность и ухудшало статистику уточнения. Укороченная модель лиганда обеспечила $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0,1589/0,2129$ против $0,1821/0,2175$ в исходной структуре и устранение разностной плотности в области лиганда (Рисунок 21).

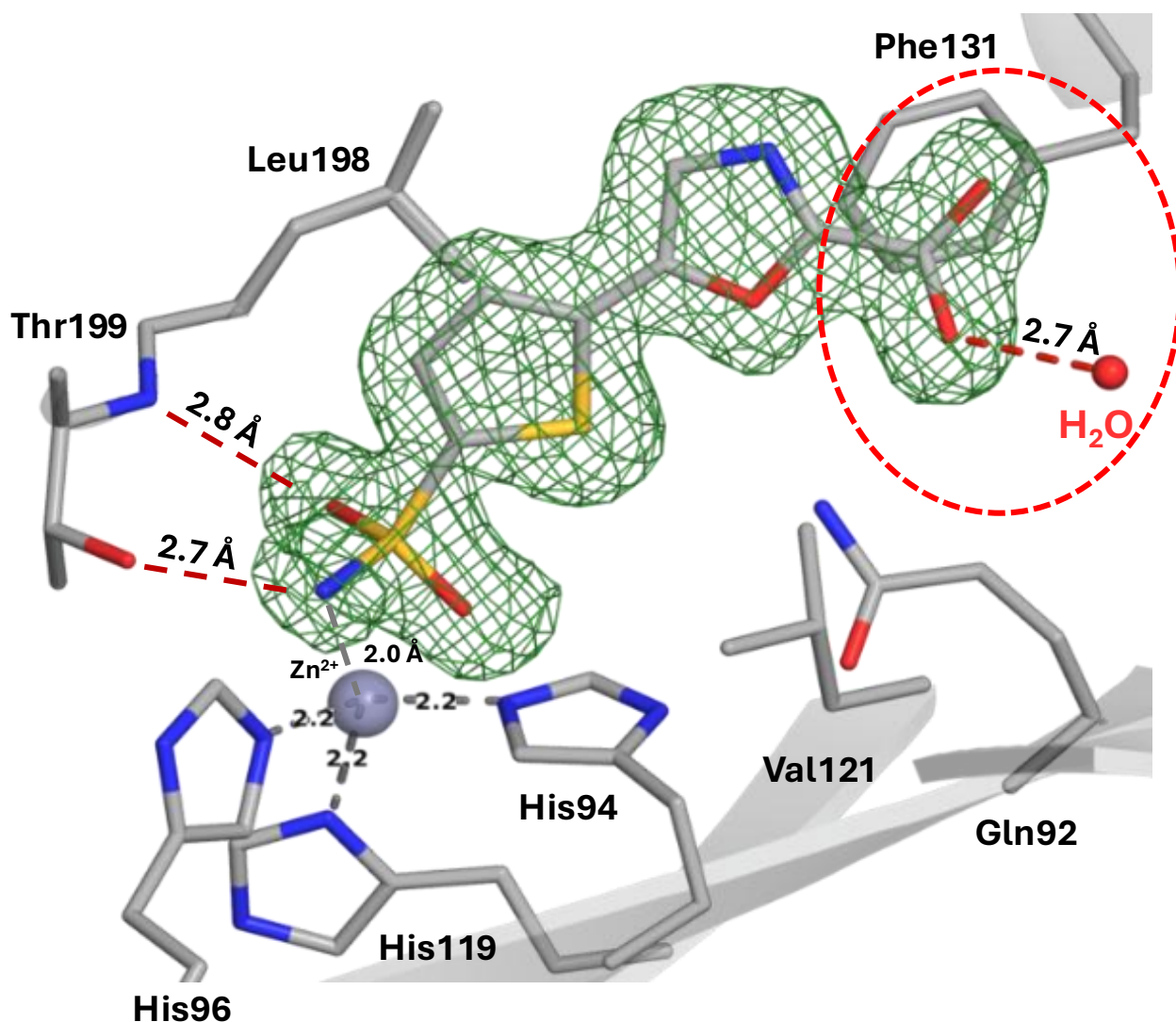


Рисунок 21. Активный центр α -hCA II в комплексе с 8V5 после переуточнения данных PDB: 5NEE. Электронная плотность (polder $mF_o - DF_c$, 3σ) показана зеленой

сеткой. Ион цинка показан серой сферой. Ключевые а.о.активного центра показаны в стержневой модели.

Среди возможных объяснений рассматривались наличие примеси в препарате для сокристаллизации и химическая модификация морфолинового фрагмента при пробоподготовке. Повторный анализ ЯМР-спектров, проведённый сотрудниками СПбГУ и ЦТФТ им. Дорогова (г. Ярославль), подтвердил целостность морфолинового кольца в препарате 8V5. Поскольку в данной работе и работе 2017 года использовался один и тот же образец соединения гипотеза о синтетической примеси исключается. Вместе с тем нами было установлено, что лиганд 8V5 не растворяется в 20 мМ NEPES при комнатной температуре и переходит в раствор лишь при нагревании до 50 °С и выше. В настоящей работе лиганд растворяли в ДМСО ($\leq 2\%$) с последующим разбавлением буфером, содержащим 100 мМ Tris–HCl (pH 8,5) и 50 мМ NaCl. Наиболее вероятным объяснением укороченной модели в структуре 2017 года следует считать частичную деградацию или химическую модификацию дистального фрагмента молекулы в условиях пробоподготовки. Полученные данные подчёркивают необходимость строгого следования критерию интерпретируемой электронной плотности при моделировании лиганда: введение фрагментов, не подкреплённых экспериментальными картами, ведёт к ошибочной интерпретации белок-лигандного комплекса.

3.2.7. Молекулярно-динамический анализ комплексов α -bCA II с 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 комплексов α -bCA II•8V8 и α -bCA II•8V5 продолжительностью 300 нс каждый. На всём протяжении расчётов оба лиганда удерживались в исходном положении в активном центре, что свидетельствует об устойчивости белок-лигандных комплексов и подтверждает кристаллографически определённые позиции лигандов.

Результаты МД комплекса с 8V8 характеризовались значениями RMSD $\sim 1\text{--}2$ Å как для лиганда, так и для белка; значимых конформационных перестроек активного центра при этом не наблюдалось. В комплексе с 8V5 RMSD лиганда первоначально возрастал до $\sim 2\text{--}3$ Å, по-видимому, вследствие релаксации стартового положения, затем стабилизировался в диапазоне $\sim 1\text{--}2$ Å; RMSD белка на протяжении всей симуляции удерживался в пределах $\sim 2\text{--}3$ Å (Рисунок 22). Анализ RMSF выявил низкую подвижность ключевых остатков активного центра: в комплексе с 8V8 — Phe131, Pro202, Thr198, Thr199, Val121, Leu198 и Val91; в комплексе с 8V5 — Phe131, Gln92, Thr198, Thr199, Val91 и Val121 (Рисунок 23).

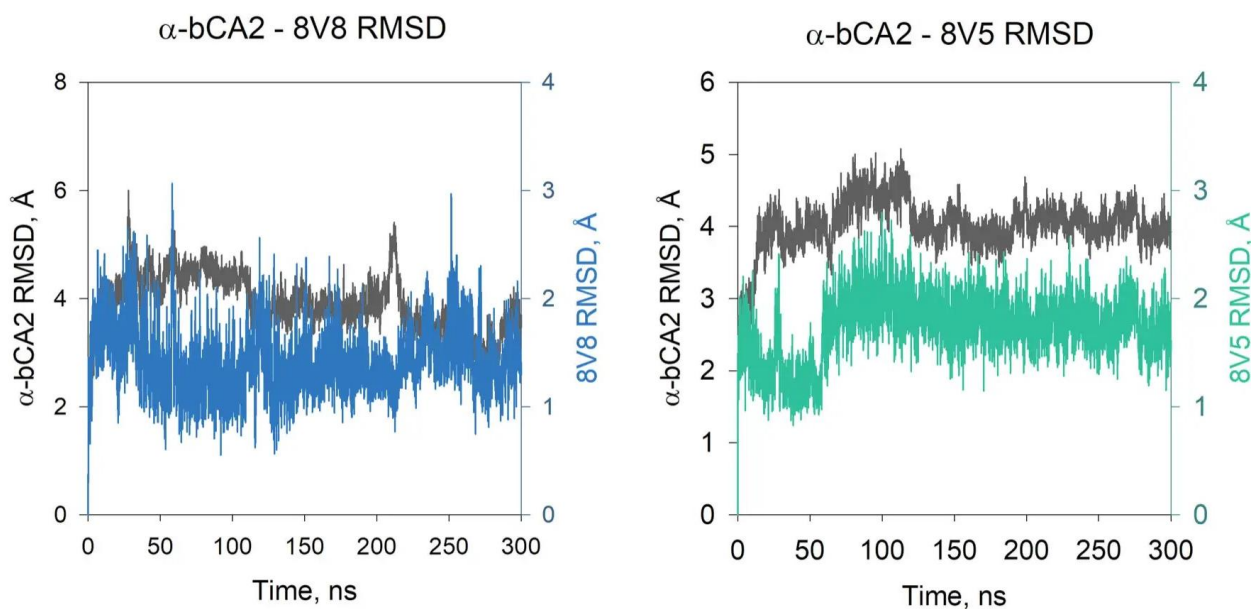


Рисунок 22. Изменения значений RMSD комплексов $\alpha\text{-bCA II}\cdot 8\text{V8}$ и $\alpha\text{-bCA II}\cdot 8\text{V5}$.

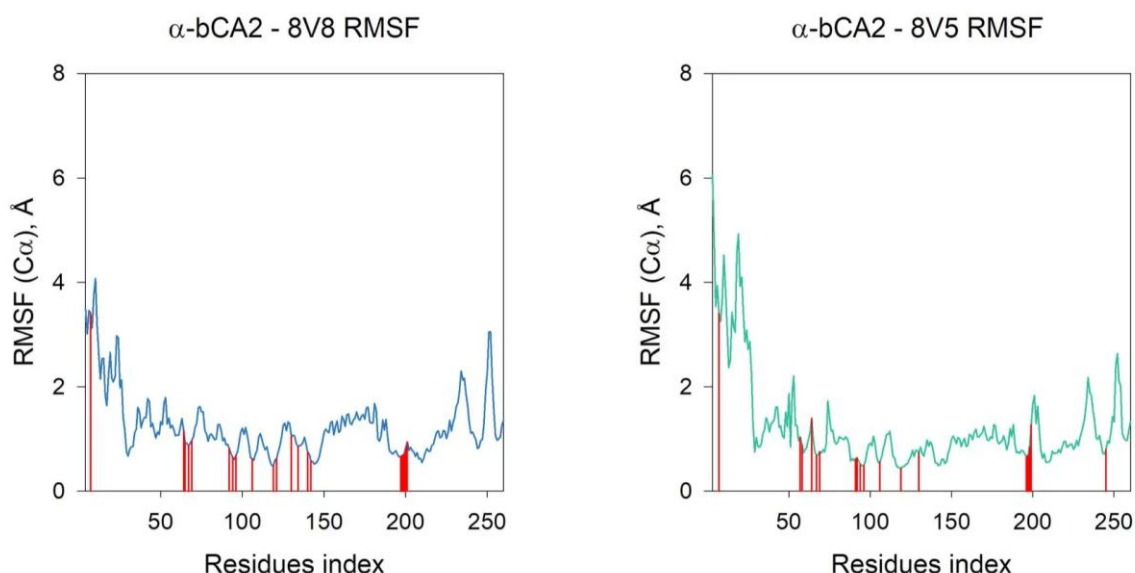


Рисунок 23. Анализ RMSF Cα-атомов α-bCA II в комплексах с ингибиторами 8V8 и 8V5.

Анализ межмолекулярных контактов по данным молекулярной динамики согласуется с кристаллографическими результатами. В комплексе с 8V8 преобладают гидрофобные взаимодействия с кластером активного центра. Наиболее устойчивы контакты с Phe131, Pro201, Pro202, Val121 и Leu198 (Рисунок 24). Консервативные координационные взаимодействия с ионом Zn^{2+} и остатками His94, His96 и His119, а также водородная связь с Thr198 сохраняются на всём протяжении траектории. В комплексе с 8V5, помимо взаимодействий с Zn^{2+} , зафиксированы водородная связь карбоксильной группы лиганда с Glu92 и СН– π /диполь– π -взаимодействие морфолинового фрагмента с Phe131 — контакт, который программный анализ формально относит к гидрофобным, однако взаимное расположение колец соответствует СН– π /диполь– π -геометрии. Водный мостик между атомом кислорода морфолинового кольца и Gln69 сохранялся на протяжении приблизительно 11% времени симуляции.

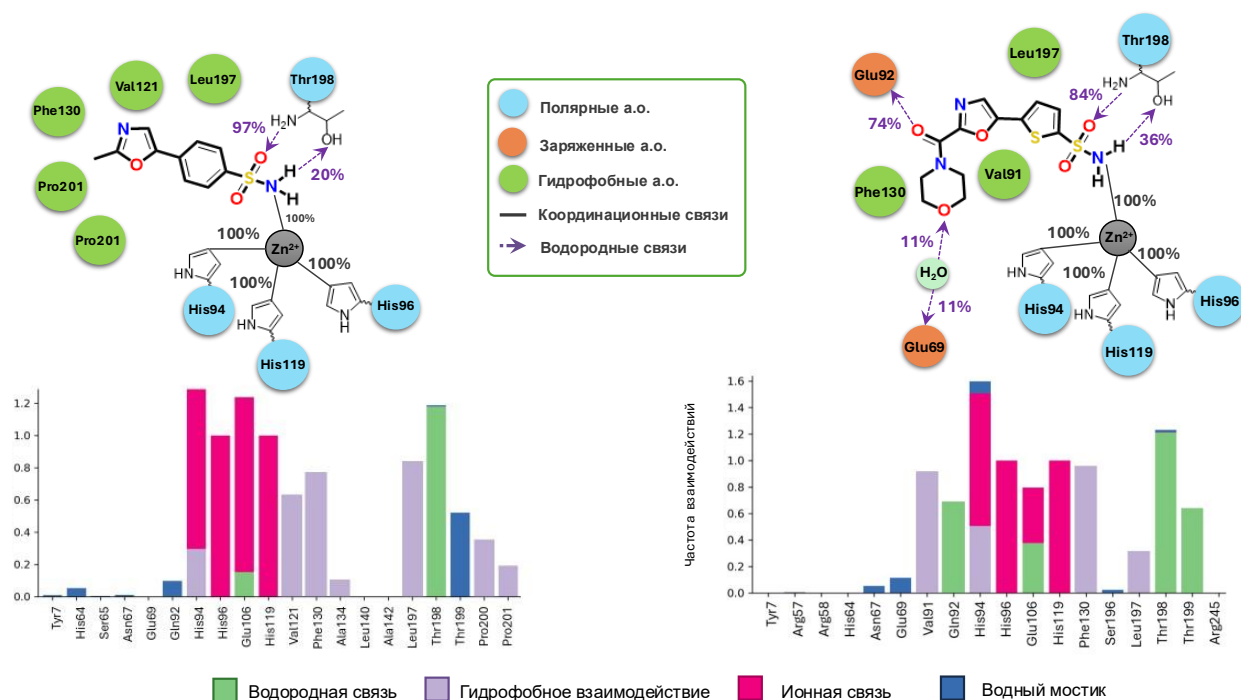


Рисунок 24. Анализ взаимодействия лиганд–белок по данным молекулярной динамики. Слева — комплекс α -bCA2•8V8, Справа — комплекс α -bCA2•8V5. Вверху — схемы ключевых контактов лиганда с остатками активного центра (показаны контакты, наблюдаемые более чем в 10% времени симуляции). Внизу — частота атомарных взаимодействий.

Таким образом, результаты молекулярно-динамических расчётов согласуются с данными структурного анализа. В случае 8V8 основную роль в стабилизации комплекса играют гидрофобные взаимодействия, тогда как для 8V5 устойчивость комплекса определяет сочетание нескольких типов взаимодействий, в различной степени представленных в области контакта белка и лиганда.

Тем самым аналитический режим системы, задачей которого является установление принципов селективности, показал для α -CA, что вклад в селективность вносит не только хвостовая часть соединения, но и форма связывающей полости, в формировании которой участвуют переменные остатки.

3.3. ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ К β -КЛАССУ

β -СА были выбраны в качестве объекта для апробации разработанной системы в связи с тем, что для данного класса накоплен значительный объём данных, охватывающих генетические, биохимические и структурные исследования. Вместе с тем именно для β -класса наиболее отчётливо проявляется проблема фрагментарности доказательной базы: наличие каталитической активности *in vitro* и данных о чувствительности изоформ к ингибиторам зачастую не сопровождается подтверждением физиологической роли конкретной изоформы и ее связи с фенотипом патогена.

В анализ были включены β -СА клинически значимых бактериальных микроорганизмов, для которых в литературе представлены сведения о нуклеотидных и аминокислотных последовательностях, каталитической активности, чувствительности к ингибиторам, структурной организации и предполагаемой физиологической роли. Всего было отобрано девять белков: CynT и CynT2 *E. coli*, mtCA1, mtCA2 и mtCA3 *M. tuberculosis*, psCA1, psCA2 и psCA3 *P. aeruginosa*, а также PCA *S. pneumoniae*.

Отбор осуществляли на основании аннотированных геномных данных, представленных в базах NCBI, UniProt и BioCyc, а также данных рецензируемых научных публикаций. При наличии экспериментальных структур использовали координаты из Protein Data Bank; при их отсутствии дополнительно привлекали предсказательные модели AlphaFold. Полученный набор данных был систематизирован в соответствии с разработанной системой критериев.

3.3.1. Критерий 1. Генетическая значимость

На первом проводилась оценка генетической значимости изоформ, поскольку именно этот критерий рассматривается как фундаментальное свидетельство терапевтического потенциала мишени. Ввиду того, что ингибирование продукта такого гена с высокой вероятностью приводит к гибели или остановке роста патогена [145, 146].

Для *E. coli* изоформа CynT входит в состав цианазопревращающего оперона и необходима для роста на цианате как единственном источнике азота [85–89]. Вторая изоформа CynT2 обеспечивает рост в стандартных аэробных условиях при атмосферной концентрации CO₂, однако её функция компенсируется повышенным содержанием CO₂ в газовой фазе, а также экспрессией CynT или карбоангидраз иных классов [87, 88].

Для *M. tuberculosis* генетическая значимость подтверждена только для mtCA2 (Rv3588c): мутанты с нарушением экспрессии данного гена демонстрируют сниженную выживаемость в условиях ограниченного CO₂. mtCA1 характеризуется условной значимостью, тогда как для mtCA3 признаков незаменимости не выявлено [71–73].

У *P. aeruginosa* генетически значимой является psCA1: её инактивация нарушает рост при низком содержании CO₂, тогда как аналогичный фенотип для psCA2 и psCA3 не показан [90–93]. Для *S. pneumoniae* делеция гена *psa* сопровождается выраженным дефектом роста в условиях ограниченного CO₂, что указывает на существенную роль PCA в обеспечении жизнеспособности патогена [188].

3.3.2. Критерий 2. Физиологическая роль

На втором этапе принципиально важно установить, связана ли конкретная изоформа с физиологическими процессами, протекающими в условиях инфекции или персистенции патогена в организме хозяина.

Среди рассматриваемых изоформ наиболее чёткой физиологической ролью обладает PCA *S. pneumoniae*: белок участвует в обеспечении внутриклеточного выживания и бикарбонат-зависимых биосинтетических путях, значимых в условиях инфекции [188]. Для *P. aeruginosa* физиологическая роль psCA1 подтверждена её участием в процессах кальцификации и формировании биопленок, а также связью с адаптацией клинических изолятов к условиям организма хозяина [90]. Для psCA2 показана повышенная индукция в ряде

клинических изолятов, однако отсутствие убедительного генетического фенотипа не позволяет однозначно оценить её физиологическую роль [91–93].

Для *M. tuberculosis* физиологическая роль установлена для mtCA2 и mtCA1: mtCA2 ассоциирована с выживанием *in vivo*, а mtCA1 — с адаптацией к условиям алиментарного стресса [71–73]. Вместе с тем метаболический контекст функционирования обоих белков остаётся установленным лишь частично.

β -СА *E. coli* выполняют физиологически более узкие функции: CynT обеспечивает метаболизм цианата, а CynT2 — рост при атмосферном уровне CO₂ в условиях, не связанных с патогенезом. Функциональная компенсация обоих изоформ исключает их из числа приоритетных терапевтических мишеней [85–89].

Таким образом, анализ по двум критериям показывает, что наибольшим терапевтическим потенциалом среди рассматриваемых β -СА обладают β -СА являются mtCA2 *M. tuberculosis*, psCA1 *P. aeruginosa* и PCA *S. pneumoniae*. Для mtCA1 также показана связь с адаптацией к стрессовым условиям, однако её значимость носит условный характер. Для остальных изоформ наблюдается либо функциональная компенсация, либо отсутствие убедительной связи с физиологически значимыми процессами.

3.3.3. Критерий 3. Биохимическая достоверность

На данном этапе был выявлен ключевой барьер, характерный для β -класса в целом, — так называемый «рН-парадокс». Максимальная каталитическая активность большинства бактериальных β -СА регистрируется *in vitro* при щелочных значениях рН (как правило, 8,0–8,5), тогда как внутриклеточный рН нейтрофильных патогенов поддерживается вблизи нейтральных значений [95–101]. Этот разрыв означает, что высокая активность, измеренная в оптимальных условиях, не может непосредственно отражать функциональную роль белка *in vivo*.

Изоформы CynT *E. coli* и psCA1 *P. aeruginosa* в большей степени удовлетворяют этому критерию, поскольку их активность сохраняется при значениях рН, близких к физиологическим [85–89, 90].

Для mtCA2 *M. tuberculosis* щелочной оптимум pH сопровождается структурно обоснованной моделью конформационного переключения активного центра, связывающей наблюдаемую pH-зависимость с изменением координации иона Zn^{2+} . Данный механизм детально рассмотрен в разделе 1.3.4 и 3.3.4.

В свою очередь, CynT2, mtCA1, mtCA3 и PCA демонстрируют высокую активность преимущественно при щелочных значениях pH, без структурного или иного обоснования этой зависимости в физиологическом контексте. Поэтому данные *in vitro* для указанных белков не могут служить достаточным аргументом в пользу их функциональной роли *in vivo*.

3.3.4. Критерий 4. Структурная интерпретация

При оценке структурных данных принималось во внимание не только наличие пространственной структуры, но и её способность объяснять механизм функционирования белка — конфигурацию активного центра, олигомерное состояние и наличие конформационно значимых переходов.

Наиболее детально охарактеризована mtCA2 *M. tuberculosis* (Rv3588c), для которой получены кристаллические структуры в двух конформациях активного центра: закрытой (PDB ID: 1YM3) и открытой (PDB ID: 2A5V) [72, 73]. В закрытом состоянии остаток Asp53 выступает четвёртым лигандом иона Zn^{2+} , блокируя координационную позицию для молекулы воды. В открытом состоянии Asp53 смещается из координационной сферы Zn^{2+} и образует солевой мостик с Arg55; координационная позиция Zn^{2+} оказывается доступной для связывания молекулы воды или гидроксид-иона. Именно гидроксид-ион, координированный ионом Zn^{2+} , выступает нуклеофилом в реакции гидратации CO_2 .

На основании этих структур ранее была предложена гипотеза pH-зависимой регуляции mtCA2, согласно которой переход между открытым и закрытым состояниями связан с изменением олигомерного состояния фермента. В качестве аргумента приводились данные динамического светорассеяния, показывающие преобладание тетрамерной формы при pH 8,4 и димерной формы при pH 7,5.

Однако опубликованные данные не позволяют однозначно связать олигомерное состояние фермента с изменением конформации активного центра. В частности, структура открытой конформации mtCA2 (PDB ID: 2A5V) была получена при pH 7,5, при котором каталитическая активность фермента практически отсутствует. Кроме того, тетрамер mtCA2 наблюдается в растворе уже при pH 7,5. Таким образом, прямая зависимость между олигомерным состоянием и конформацией активного центра экспериментальными данными не подтверждена.

Для проверки предполагаемой связи между олигомерным состоянием и конформацией активного центра были проведены молекулярно-динамические расчёты четырёх систем: димера и тетрамера mtCA2 в открытом и закрытом конформациях активного центра. В качестве исходных моделей использовали структуры 1YM3 и 2A5V. Каждую систему рассчитывали в трёх независимых повторах по 300 нс. Всего проанализировано 12 траекторий и 36 активных центров.

Анализ траекторий показал, что положение Asp53 относительно иона Zn^{2+} оставалось стабильным во всех системах на протяжении всего расчётного времени. В закрытых системах расстояние Zn^{2+} –Asp53 держалось в пределах 0,197–0,199 нм по всем 18 активным центрам при стандартном отклонении внутри траектории 0,005 нм. В открытых — от 0,407 до 0,482 нм при отклонениях 0,018–0,075 нм — как в димере, так и в тетрамере (Рисунок 25; Таблица 10).

Два диапазона нигде не перекрываются: ни один активный центр ни в одной олигомерной форме не приблизился к значению, характерному для другой конформации. Взаимодействие Asp53–Arg55, характерное для открытой конформации, оставалось стабильным в обеих олигомерных формах: при критерии 0,4 нм контакт присутствовал в каждом кадре каждой открытой траектории, во всех активных центрах и димера, и тетрамера, при среднем расстоянии 0,269 нм. Расстояния Zn^{2+} –Cys51, Zn^{2+} –His104 и Zn^{2+} –Cys107 не изменялись на протяжении симуляций: по всем 36 активным центрам Zn–S до Cys51 лежало в пределах 0,250–0,260 нм, до Cys107 — 0,252–0,259 нм, Zn–N до His104 — 0,217–0,222 нм. Разброс между активными центрами внутри одной системы не превышал 0,008 нм.

Самопроизвольного перехода между открытой и закрытой конформациями не наблюдалось ни в одной из траекторий — ни в димерных, ни в тетрамерных системах.

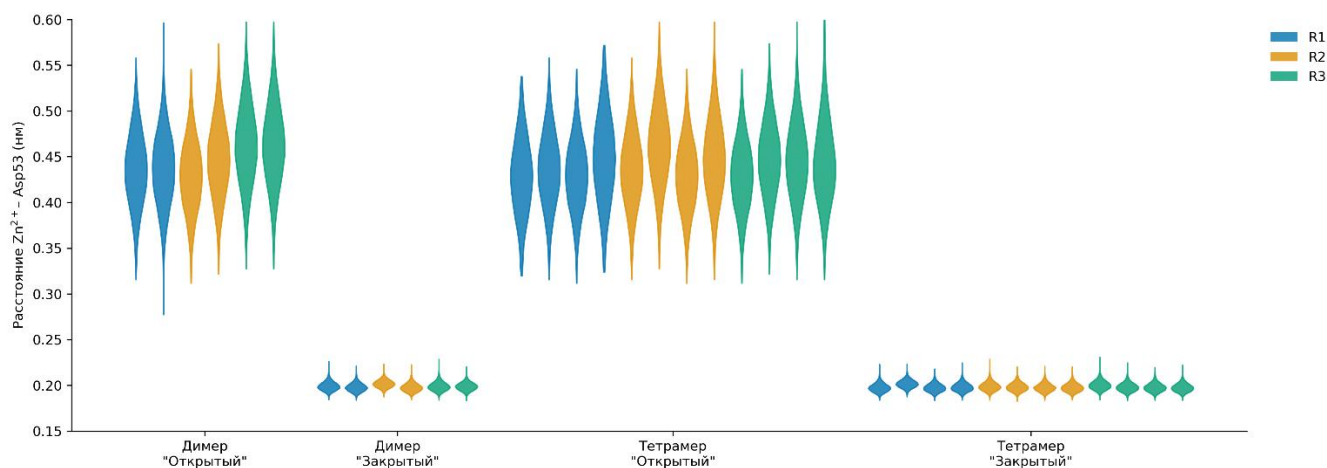


Рисунок 25. Распределение расстояний Zn^{2+} –Asp53 в открытой и закрытой конформациях димера и тетрамера mtCA2 по данным МД расчётов. Каждая «скрипка» соответствует одному активному центру в одном из трёх независимых повторов (R1–R3, показаны цветом). По оси ординат — расстояние от иона Zn^{2+} до ближайшего атома кислорода Asp53, нм; по оси абсцисс — система и конформация.

Расчётные расстояния Zn^{2+} –лиганд воспроизводят кристаллографические (Таблица 11). Расстояние Zn–N до His104 составляет 2,05–2,18 Å в кристаллических структурах и 2,19–2,21 Å в расчёте. Расстояния Zn–S до Cys51 и Cys107 длиннее в обоих случаях: 2,30–2,37 Å в кристаллах и 2,54–2,59 Å в расчёте. В закрытой конформации Asp53 координирует Zn^{2+} на расстоянии 2,10 Å в структуре 1YM3 и 1,98 Å в расчёте; в открытой — смещён до 4,43 Å в структуре 2A5V и до 4,40–4,47 Å в расчёте. Удлинение Zn–S примерно на 0,2 Å типично для классических силовых полей, в которых металл описывается точечным зарядом.

Таблица 10. Расстояния в активном центре mtCA2 по данным молекулярно-динамических расчётов. Средние $\pm$ SD по кадрам каждой траектории, нм. Расстояния вычисляли до атома SG для Cys51 и Cys107, до NE2 для His104, до ближайшего из OD1/OD2 для Asp53; расстояние Asp53–Arg55 — между OD1/OD2 и NE/NH1/NH2. Частота контакта — доля кадров с расстоянием Asp53–Arg55 не более 0,4 нм.

Система	Повтор	Цепь	Zn–Cys51	Zn–Cys107	Zn–His104	Zn–Asp53	Asp53–Arg55	Контакт, %
Димер (открытый)	R1	A	0.2552 $\pm$ 0.0103	0.2552 $\pm$ 0.0098	0.2224 $\pm$ 0.0086	0.4756 $\pm$ 0.0658	0.2690 $\pm$ 0.0087	100%
	R1	B	0.2563 $\pm$ 0.0077	0.2560 $\pm$ 0.0076	0.2200 $\pm$ 0.0060	0.4434 $\pm$ 0.0475	0.2689 $\pm$ 0.0089	100%
	R2	A	0.2558 $\pm$ 0.0074	0.2545 $\pm$ 0.0069	0.2197 $\pm$ 0.0060	0.4367 $\pm$ 0.0405	0.2707 $\pm$ 0.0095	100%
	R2	B	0.2541 $\pm$ 0.0069	0.2535 $\pm$ 0.0068	0.2206 $\pm$ 0.0063	0.4214 $\pm$ 0.0184	0.2693 $\pm$ 0.0095	100%
	R3	A	0.2556 $\pm$ 0.0076	0.2549 $\pm$ 0.0072	0.2196 $\pm$ 0.0060	0.4508 $\pm$ 0.0751	0.2692 $\pm$ 0.0094	100%
	R3	B	0.2598 $\pm$ 0.0085	0.2536 $\pm$ 0.0068	0.2205 $\pm$ 0.0063	0.4532 $\pm$ 0.0385	0.2691 $\pm$ 0.0091	100%
Димер (закрытый)	R1	A	0.2550 $\pm$ 0.0072	0.2594 $\pm$ 0.0086	0.2177 $\pm$ 0.0056	0.1976 $\pm$ 0.0046	—	—
	R1	B	0.2547 $\pm$ 0.0071	0.2551 $\pm$ 0.0071	0.2194 $\pm$ 0.0060	0.1975 $\pm$ 0.0045	—	—
	R2	A	0.2565 $\pm$ 0.0078	0.2547 $\pm$ 0.0073	0.2196 $\pm$ 0.0061	0.1977 $\pm$ 0.0046	—	—
	R2	B	0.2561 $\pm$ 0.0086	0.2565 $\pm$ 0.0086	0.2176 $\pm$ 0.0056	0.1977 $\pm$ 0.0046	—	—
	R3	A	0.2504 $\pm$ 0.0093	0.2518 $\pm$ 0.0093	0.2190 $\pm$ 0.0076	0.1982 $\pm$ 0.0046	—	—
	R3	B	0.2540 $\pm$ 0.0103	0.2545 $\pm$ 0.0099	0.2216 $\pm$ 0.0085	0.1978 $\pm$ 0.0046	—	—
Тетрамер (открытый)	R1	A	0.2542 $\pm$ 0.0088	0.2547 $\pm$ 0.0073	0.2171 $\pm$ 0.0056	0.4624 $\pm$ 0.0727	0.2689 $\pm$ 0.0089	100%
	R1	B	0.2556 $\pm$ 0.0087	0.2546 $\pm$ 0.0088	0.2175 $\pm$ 0.0056	0.4815 $\pm$ 0.0620	0.2691 $\pm$ 0.0094	100%
	R1	C	0.2558 $\pm$ 0.0075	0.2560 $\pm$ 0.0087	0.2191 $\pm$ 0.0059	0.4423 $\pm$ 0.0448	0.2699 $\pm$ 0.0094	100%
	R1	D	0.2566 $\pm$ 0.0079	0.2547 $\pm$ 0.0072	0.2194 $\pm$ 0.0060	0.4239 $\pm$ 0.0186	0.2703 $\pm$ 0.0095	100%
	R2	A	0.2545 $\pm$ 0.0072	0.2551 $\pm$ 0.0071	0.2207 $\pm$ 0.0064	0.4478 $\pm$ 0.0496	0.2705 $\pm$ 0.0095	100%
	R2	B	0.2546 $\pm$ 0.0071	0.2551 $\pm$ 0.0071	0.2195 $\pm$ 0.0061	0.4106 $\pm$ 0.0320	0.2667 $\pm$ 0.0084	100%
	R2	C	0.2544 $\pm$ 0.0070	0.2553 $\pm$ 0.0072	0.2195 $\pm$ 0.0061	0.4388 $\pm$ 0.0453	0.2685 $\pm$ 0.0087	100%
	R2	D	0.2548 $\pm$ 0.0072	0.2554 $\pm$ 0.0072	0.2212 $\pm$ 0.0065	0.4068 $\pm$ 0.0300	0.2688 $\pm$ 0.0087	100%
	R3	A	0.2584 $\pm$ 0.0083	0.2544 $\pm$ 0.0071	0.2217 $\pm$ 0.0066	0.4287 $\pm$ 0.0436	0.2690 $\pm$ 0.0087	100%
	R3	B	0.2587 $\pm$ 0.0083	0.2560 $\pm$ 0.0080	0.2196 $\pm$ 0.0066	0.4452 $\pm$ 0.0449	0.2690 $\pm$ 0.0088	100%
	R3	C	0.2590 $\pm$ 0.0085	0.2545 $\pm$ 0.0072	0.2208 $\pm$ 0.0063	0.4468 $\pm$ 0.0446	0.2687 $\pm$ 0.0087	100%

	R3	D	0.2603 ± 0.0086	0.2548 ± 0.0071	0.2211 ± 0.0063	0.4473 ± 0.0497	0.2691 ± 0.0091	100%
Тетрамер (закрытый)	R1	A	0.2601 ± 0.0086	0.2547 ± 0.0078	0.2204 ± 0.0062	0.1975 ± 0.0045	—	—
	R1	B	0.2563 ± 0.0082	0.2560 ± 0.0075	0.2207 ± 0.0064	0.1972 ± 0.0045	—	—
	R1	C	0.2592 ± 0.0083	0.2536 ± 0.0068	0.2211 ± 0.0064	0.1985 ± 0.0047	—	—
	R1	D	0.2599 ± 0.0086	0.2548 ± 0.0071	0.2211 ± 0.0064	0.1976 ± 0.0046	—	—
	R2	A	0.2590 ± 0.0084	0.2553 ± 0.0073	0.2209 ± 0.0064	0.1978 ± 0.0046	—	—
	R2	B	0.2591 ± 0.0083	0.2553 ± 0.0072	0.2204 ± 0.0063	0.1980 ± 0.0047	—	—
	R2	C	0.2578 ± 0.0081	0.2546 ± 0.0070	0.2217 ± 0.0066	0.1988 ± 0.0044	—	—
	R2	D	0.2581 ± 0.0081	0.2546 ± 0.0070	0.2217 ± 0.0066	0.1975 ± 0.0046	—	—
	R3	A	0.2593 ± 0.0084	0.2537 ± 0.0069	0.2205 ± 0.0062	0.1977 ± 0.0045	—	—
	R3	B	0.2591 ± 0.0083	0.2538 ± 0.0069	0.2204 ± 0.0063	0.1980 ± 0.0047	—	—
	R3	C	0.2591 ± 0.0084	0.2556 ± 0.0075	0.2208 ± 0.0064	0.1980 ± 0.0046	—	—
	R3	D	0.2592 ± 0.0085	0.2559 ± 0.0075	0.2207 ± 0.0063	0.1972 ± 0.0045	—	—

Таблица 11. Расстояния Zn²⁺–лиганд в кристаллических структурах и в МД расчёте, Å. Расчётные значения — средние по всем активным центрам и повторам каждой системы.

Расстояние	1YU3 (закрытый)	Закрытый димер	Закрытый тетрамер	2A5V (открытый)	Открытый димер	Открытый тетрамер
Zn–Cys51	2.37	2.54	2.59	2.30	2.56	2.56
Zn–Cys107	2.30	2.55	2.55	2.31	2.55	2.55
Zn–His104	2.05	2.19	2.21	2.18	2.20	2.20
Zn–Asp53	2.10	1.98	1.98	4.43	4.47	4.40

Полученные значения RMSD основной цепи подтвердили, что каждая цепь оставалась стабильной во всех траекториях (Рисунок 26). Однако RMSD, усреднённый по цепи, не отражает стабильность межузловых интерфейсов. Для оценки того, сохраняется ли олигомерная сборка на протяжении длительных симуляций и влияет ли она на конформацию активного центра, были проанализированы интерфейсы mtCA2.

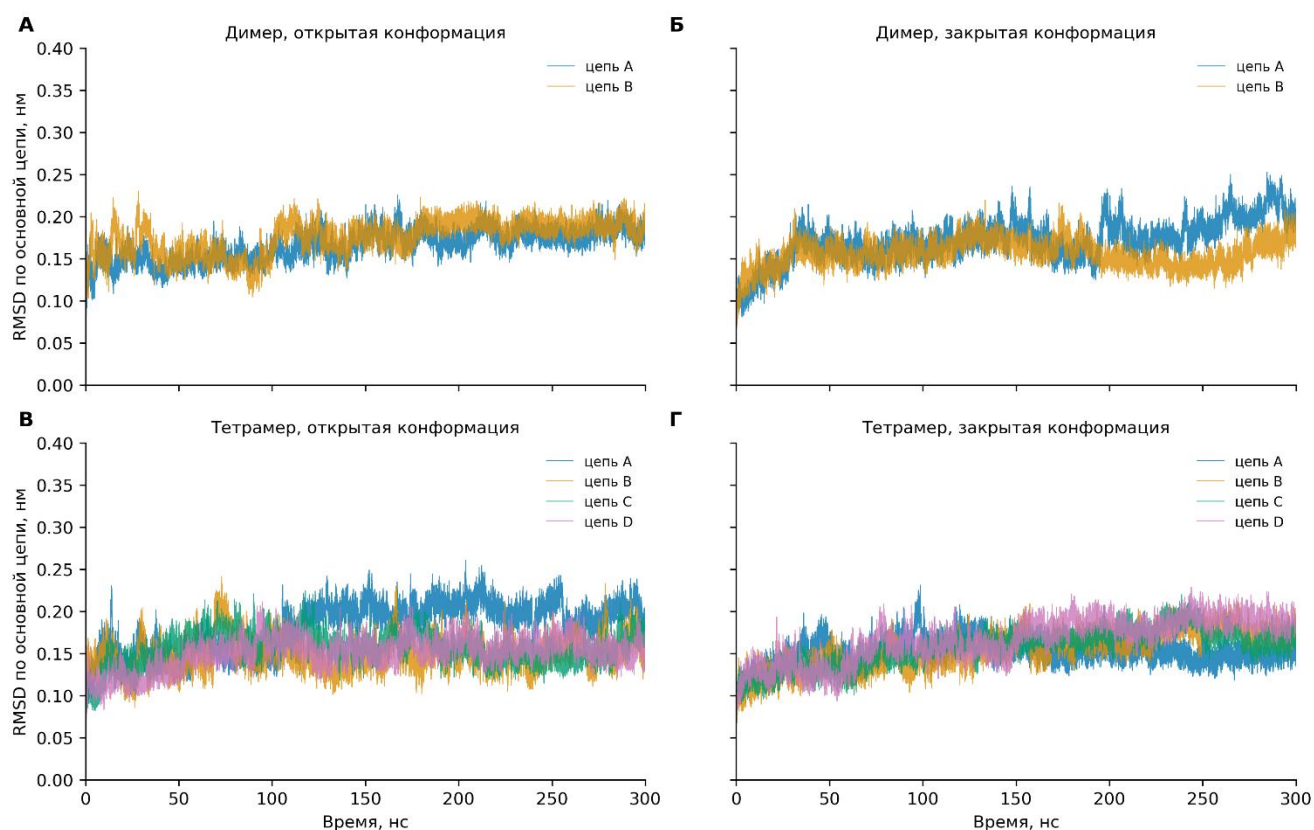


Рисунок 26. RMSD основной цепи отдельных цепей в ходе молекулярно-динамических симуляций mtCA2. А — димер, открытая конформация; Б — димер, закрытая конформация; В — тетрамер, открытая конформация; Г — тетрамер, закрытая конформация. Показан один повтор МД для каждой системы. Отдельные цепи показаны разным цветом.

Тетрамер mtCA2 образует два типа межсубъединичных интерфейсов: внутридимерный и димер-димерный. Их стабильность оценивали по площади поверхности, экранированной от растворителя (BSA), числу межсубъединичных контактов и расстоянию между центрами масс субъединиц (COM), а взаимную ориентацию субъединиц характеризовали углом между главными осями инерции (Таблицы 12 и 13).

Внутридимерный интерфейс во всех системах оставался стабильным. Погружённая площадь составила $68,7 \pm 1,4 \text{ нм}^2$ в открытом димере и $69,5 \pm 0,5 \text{ нм}^2$ в закрытом. Внутри тетрамеров те же интерфейсы дали $65,9 \pm 0,6$ и $64,4 \pm 0,8 \text{ нм}^2$. Расстояния между центрами масс субъединиц во всех четырёх системах укладывались в 1,98–2,11 нм. Включение димера в состав тетрамера не

перестраивает внутридимерный интерфейс. Конформация активного центра на него также не влияет.

Таблица 12. Параметры межсубъединичных интерфейсов mtCA2 по повторам. Средние $\pm$ SD по кадрам каждой траектории. Контакты — пары тяжёлых атомов из разных цепей в пределах 0,45 нм; BSA — площадь поверхности, экранированной от растворителя; COM — расстояние между центрами масс субъединиц.

Система	Интерфейс	Повтор	Контакты	BSA (нм ²)	COM (нм)
Димер (открытый)	A–B	R1	5408 $\pm$ 259	68.49 $\pm$ 1.62	2.069 $\pm$ 0.022
	A–B	R2	5901 $\pm$ 212	70.12 $\pm$ 1.73	2.058 $\pm$ 0.019
	A–B	R3	5165 $\pm$ 253	67.41 $\pm$ 1.53	2.063 $\pm$ 0.022
Димер (закрытый)	A–B	R1	5580 $\pm$ 212	69.29 $\pm$ 1.62	2.062 $\pm$ 0.017
	A–B	R2	5790 $\pm$ 202	70.08 $\pm$ 1.98	2.076 $\pm$ 0.019
	A–B	R3	5663 $\pm$ 348	69.04 $\pm$ 2.45	2.095 $\pm$ 0.018
Тетрамер (открытый)	внутридимерный	R1	4965 $\pm$ 231	66.55 $\pm$ 1.46	2.108 $\pm$ 0.022
	внутридимерный	R2	5024 $\pm$ 262	65.31 $\pm$ 2.09	2.068 $\pm$ 0.021
	внутридимерный	R3	5081 $\pm$ 199	65.77 $\pm$ 1.44	2.044 $\pm$ 0.026
	димер-димерный	R1	562 $\pm$ 149	12.82 $\pm$ 2.20	3.709 $\pm$ 0.063
	димер-димерный	R2	997 $\pm$ 127	21.63 $\pm$ 1.66	3.502 $\pm$ 0.028
	димер-димерный	R3	1196 $\pm$ 116	23.04 $\pm$ 1.32	3.470 $\pm$ 0.024
Тетрамер (закрытый)	внутридимерный	R1	4987 $\pm$ 254	64.24 $\pm$ 1.87	1.984 $\pm$ 0.019
	внутридимерный	R2	4918 $\pm$ 258	63.73 $\pm$ 1.66	2.035 $\pm$ 0.024
	внутридимерный	R3	4968 $\pm$ 235	65.26 $\pm$ 2.27	1.993 $\pm$ 0.030
	димер-димерный	R1	1187 $\pm$ 129	22.72 $\pm$ 1.30	3.464 $\pm$ 0.022
	димер-димерный	R2	1014 $\pm$ 150	20.95 $\pm$ 1.74	3.462 $\pm$ 0.028
	димер-димерный	R3	1213 $\pm$ 204	23.37 $\pm$ 1.93	3.466 $\pm$ 0.032

Димер-димерный интерфейс подвижнее. Его BSA составила $19,2 \pm 5,5$ нм² в открытом тетрамере и $22,4 \pm 1,3$ нм² в закрытом; расстояния между центрами масс димеров держались в пределах 3,46–3,71 нм. Оба тетрамера сохраняли олигомерную форму на протяжении всех 300 нс. В одном повторе открытого тетрамера BSA снизилась с 18,4 до 12,3 нм² за последние 50 нс — при этом расстояние между центрами масс оставалось равным $3,709 \pm 0,063$ нм (Рисунок 27). Угол между главными осями инерции в том же повторе изменился не более чем на $2,3^\circ$ внутри траектории: димеры не разошлись, а повернулись друг относительно друга. Между повторами угол варьировал от 61 до 77° — этот разброс задан стартовыми конфигурациями.

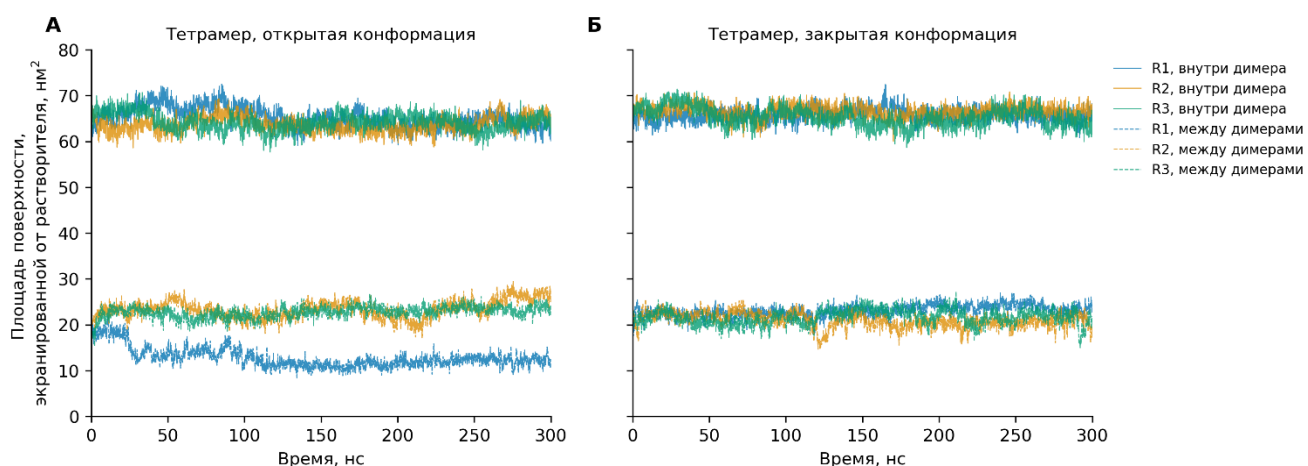


Рисунок 27. Изменение площади поверхности, экранированной от растворителя (BSA), внутримерного и димер-димерного интерфейсов тетрамера mtCA2 в ходе МД симуляций. А — открытая конформация. Б — закрытая конформация. Сплошные линии — внутримерный интерфейс, пунктирные — димер-димерный. независимые повторы (R1–R3) показаны разным цветом. BSA рассчитывали как разность между суммой площадей изолированных цепей и площадью пары с шагом отбора 100 пс.

Внутримерный угол у открытого и закрытого тетрамеров различался — $65,0 \pm 0,7^\circ$ против $71,8 \pm 0,3^\circ$. Это различие присутствовало уже в первых кадрах запусков — $66,5$ и $70,8^\circ$ — и унаследовано от двух разных кристаллографических моделей. Повтор с наиболее слабым димер-димерным контактом дал расстояния в активном центре, неотличимые от двух других: состояние димер-димерного интерфейса не сказывается на геометрии активного центра.

Таблица 13. Угол между главными осями инерции двух субъединиц, образующих каждый интерфейс, градусы. Значения — средние $\pm$ SD по кадрам каждой траектории; последний столбец — среднее $\pm$ SD по трём повторам.

Система	Интерфейс	Повтор			Средние $\pm$ SD
		R1	R2	R3	
внутридимерный	Тетрамер (открытый)	65.8 ± 1.7	64.8 ± 1.5	64.5 ± 1.8	65.0 ± 0.7
внутридимерный	Тетрамер (закрытый)	71.5 ± 1.5	72.1 ± 1.6	71.8 ± 2.0	71.8 ± 0.3
димер-димерный	Тетрамер (открытый)	61.4 ± 2.3	71.7 ± 2.0	69.4 ± 2.2	67.5 ± 5.4
димер-димерный	Тетрамер (закрытый)	77.3 ± 2.0	74.8 ± 1.6	76.5 ± 1.6	76.2 ± 1.3

Таким образом, олигомерное состояние не определяет конформацию активного центра. Открытая и закрытая конформации устойчивы независимо от олигомерной организации белка, что согласуется с данными Covarrubias et al. (2006) о присутствии тетрамера при pH 7,5 в отсутствие каталитической активности.

Эти данные допускают иную интерпретацию pH-зависимой активации β -СА. Вероятно, увеличение каталитической активности при щелочных значениях pH связано с повышением концентрации OH^- -ионов в растворе и последующим координированием гидроксид-иона каталитическим Zn^{2+} в открытой конформации активного центра. Открытая конформация mtCA2 наблюдается уже при pH 7,5, где каталитическая активность отсутствует. Значит, ключевым условием катализа является именно образование Zn^{2+} -координированного гидроксид-иона, а не сам переход в открытую конформацию. Отсюда следует, что pH-зависимая регуляция β -СА определяется прежде всего локальными условиями в месте расположения фермента в клетке, а не значением pH цитоплазмы в целом. Локального повышения концентрации OH^- , например вблизи мембраны, может быть достаточно для перевода фермента в каталитически активное состояние. Существование дополнительных механизмов регуляции при этом не исключается.

Сказанное выше применимо и к задаче разработки ингибиторов β -СА. Поскольку конформация активного центра не зависит от олигомерного состояния, в качестве структурной модели мишени могут использоваться обе олигомерные формы. Открытая и закрытая конформации при этом задают разные по геометрии сайты связывания: в закрытой конформации координационная позиция Zn^{2+} занята остатком Asp53, поэтому схема связывания, разработанная для сульфонамидных ингибиторов α -СА, к ней неприменима.

Анализ критериев 3 и 4 показывает, что для большинства β -СА высокая каталитическая активность *in vitro* при щелочных значениях pH длительное время не имела однозначного физиологического объяснения. Предложенная ранее гипотеза pH-зависимого конформационного переключения активного центра β -СА не согласуется ни с совокупностью опубликованных данных, ни с результатами молекулярно-динамических расчётов.

3.3.5. Критерий 5. Связь с фенотипом/патогенезом

Фенотипическая характеристика оказалась одним из наиболее слабых звеньев для β -класса в целом. Для большинства рассматриваемых изоформ прямого подтверждения того, что ингибирование конкретной карбоангидразы воспроизводит наблюдаемый клеточный или физиологический эффект, получено не было.

Наиболее убедительным примером является psCA1 *P. aeruginosa*: как нокаут *psCA1*, так и действие ингибиторов приводят к сходному нарушению кальцификации, что позволяет рассматривать psCA1 как наиболее фенотипически достоверную мишень среди анализируемых β -СА [90].

Для β -СА *M. tuberculosis*, несмотря на наличие данных о генетической значимости и чувствительности к ингибиторам *in vivo*, фенотипические эффекты, разрешённые на уровне отдельных изоформ, не охарактеризованы.

В целом для большинства β -СА наблюдаемые эффекты ингибирующих соединений отражают нарушение общего баланса $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$, а не специфическое воздействие на конкретный фермент.

3.3.6. Критерий 6. Селективность и безопасность

Ни одна из рассматриваемых β -СА в настоящее время не обеспечена ингибиторами с профилем селективности, достаточным для клинического применения. Основная проблема состоит в том, что большинство известных соединений основано на сульфонамидных скаффолдах, способных ингибировать α -СА человека, прежде всего hCA II.

Показательным примером является соединение CAI0019, ингибирующее карбоангидразу *Enterococcus faecium* с $K_i = 66,9$ нМ [116]. Анализ литературных данных, проведённый в рамках настоящей работы, показал, что данное соединение было изначально разработано как ингибитор α -СА человека и проявляет значительно более высокую активность в отношении hCA II ($K_i = 0,32$ нМ) [117] — то есть обладает обратной селективностью относительно заявленной бактериальной мишени. Этот пример наглядно демонстрирует системную проблему поля: активность соединения в отношении бактериального фермента нередко интерпретируется в публикациях как свидетельство его антибактериального потенциала без должной оценки риска подавления СА хозяина, тогда как именно эта оценка должна быть первоочередной на ранних этапах разработки. Количественные критерии селективности, включая пороговое значение $\text{ИС} \geq 100\text{--}200$ по отношению к изоформам человека, сформулированы в рамках настоящей работы и опубликованы в [189].

3.3.7. Классификация β -СА

Последовательное применение разработанной системы позволило распределить β -СА по группам A–D в зависимости от их потенциала как мишеней для антибактериальных препаратов. Так же был описан и характер существующих ограничений [189].

Так, к группе В отнесена psCA1 *P. aeruginosa*. Для нее подтверждена прямая связь ингибирование продукта гена *psCA1* с факторами вирулентности. Основным ограничением для данной изоформы остаётся отсутствие ингибиторов с достаточным профилем селективности.

К группе С отнесены CynT *E. coli*, mtCA1 и mtCA2 *M. tuberculosis*, а также PCA *S. pneumoniae*. Для CynT основным ограничением является узкая физиологическая роль, связанная преимущественно с метаболизмом цианата. Для mtCA1, mtCA2 и PCA сохраняются ограничения, связанные с интерпретацией биохимических и структурных данных, прежде всего pH-зависимой активности β -СА.

Предложенная ранее модель pH-зависимого конформационного переключения активного центра длительное время использовалась для объяснения pH-зависимой регуляции β -СА. Однако проведённый анализ показал, что данная модель не согласуется с опубликованными экспериментальными данными и результатами молекулярно-динамических расчётов. На основании полученных результатов предложен альтернативный механизм pH-зависимой активации β -СА.

К группе D отнесены CynT2 *E. coli*, mtCA3 *M. tuberculosis*, psCA2 и psCA3 *P. aeruginosa*. Для данных изоформ сохраняются ограничения, связанные с отсутствием подтверждённой физиологической роли и возможностью функциональной компенсации.

Таким образом, применение разработанной системы позволило провести классификацию β -СА как потенциальных мишеней, и определить ограничения, долгое время препятствующие их переходу в категорию полноценных терапевтических кандидатов.

3.4. ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ К γ – КЛАССУ

Для γ -СА объём экспериментальных данных значительно меньше, чем для α - и β -класса, поэтому применение системы в валидационном или аналитическом режиме к данному классу невозможно. Критерии использованы как основа для корректной аннотации белка и построения проверяемой гипотезы о его функции. Объектом анализа выбрана γ -СА кишечной палочки, изоформа EсoCA γ . К началу настоящего исследования для данного белка была опубликована каталитическая активность, однако его штаммовая принадлежность, функция N-концевого домена и организация полноразмерной пространственной структуры оставались неопределёнными.

3.4.1. Критерий 1. Генетическая значимость EсoCA γ

На первом этапе была уточнена штаммовая принадлежность полноразмерной EсoCA γ . Установлено, что в лабораторных штаммах *E. coli*, включая K-12 substr. MG1655, K-12 substr. W3110, BL21(DE3) и XL1-Blue, полноразмерная форма отсутствует. В геномах данных штаммов представлен только укороченный белок YrdA длиной 184 аминокислотных остатка, лишённый N-концевого домена протяжённостью 72 остатка. При этом каталитический домен YrdA идентичен каталитическому домену EсoCA γ на 100 %. Анализ геномного окружения с использованием базы данных EсoCус не выявил признаков альтернативных сайтов инициации трансляции, дополнительных рамок считывания или посттранскрипционных механизмов, способных обеспечить синтез N-концевого фрагмента. Таким образом, полноразмерная EсoCA γ в геноме *E. coli* K-12 не кодируется.

Для оценки распространённости полноразмерной формы среди других штаммов и родственных видов был выполнен BLASTp-анализ последовательности EсoCA γ (WP_009008373.1) по базам UniProtKB и NCBI. Анализ выявил многочисленные ортологи у представителей родов *Escherichia* и *Shigella*. Все обнаруженные белки имели длину 256 аминокислотных остатков и содержали характерный N-концевой фрагмент, отсутствующий у YrdA штамма K-12.

Идентичность последовательностей составляла 95–100 %, значения E-value для большинства совпадений равны 0.0. Стопроцентная идентичность зафиксирована для штаммов *E. coli* O8 и O26, а также *Shigella boydii*. Высокое сходство (98,8–99,2 %) характерно для клинически значимых линий — *E. coli* O157:H7, АРЕС, UTI89, штаммов, ассоциированных с неонатальным менингитом, и представителей *Shigella sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae*. Наиболее удалённые гомологи сохраняют идентичность не ниже ~95 % по всей длине белка (Таблица 14).

Таблица 14. Топ-20 результатов BLASTp для последовательности EсoCA_γ (WP_009008373.1). Остальные результаты поиска приведены в Приложении Б, таблица П2.

Accession	Организм	Штамм	Bit Score	E-value	Идентичность (%)	Ген	Длина (а.о.)
A0A9P2ID48	<i>Escherichia coli</i> O8	EcoliO8-0002A	519	0.0	100%	DP913_22660	256 а.о.
A0AA35F7L4	<i>Escherichia coli</i> O26	RM8426	519	0.0	100%	I3M_24345	256 а.о.
A0A9Q5U8X2	<i>Shigella boydii</i>	227	519	0.0	100%	CEH00_11850	256 а.о.
C3SRD7	<i>Escherichia coli</i>	Multiple strains	519	0.0	100%	yrdA	256 а.о.
A0A0H3JPK3	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	EDL933	519	0.0	99.6%	Z4650	256 а.о.
A0A1X3IUF1	<i>Escherichia coli</i>	TA447	516	0.0	99.6%	ECXG_02109	256 а.о.
A0A0H2Z486	<i>Escherichia coli</i> O1:K1 / APEC	APEC O1	516	0.0	99.2%	APECO1_3166	256 а.о.
A0A2G8ZMY4	<i>Escherichia coli</i>	Neonatal meningitis strains	516	0.0	99.2%	D3C88_29505	256 а.о.
Q1R653	<i>Escherichia coli</i>	UTI89	516	0.0	99.2%	yrdA, UTI89_C3724	256 а.о.
Q3YWX9	<i>Shigella sonnei</i>	Ss046	515	0.0	99.2%	yrdA, SSON_3420	256 а.о.
A0A271U1H0	<i>Escherichia coli</i>	B8S56; T0181B. E-10	515	0.0	99.2%	D4N09_20060	256 а.о.
A0A200NJ30	<i>Shigella flexneri</i>	ESBL-06065-006	514	0.0	99.2%	CEG97_10655	256 а.о.
A0A1X3JBL2	<i>Escherichia coli</i>	H386	514	0.0	99.2%	ECVG_05240	256 а.о.

A0A236LML5	<i>Shigella sonnei</i>	ECH+15	514	0.0	99.2%	CI727_21070	256 a.o.
A0A398R136	<i>Shigella boydii</i>	287711	514	0.0	99.2%	DLV22_22625	256 a.o.
A0A979H4V2	<i>Escherichia coli</i>	SE11	514	0.0	99.2%	ECSE_3554	256 a.o.
J7R9P7	<i>Escherichia coli</i>	Multiple strains	514	0.0	99.2%	CCS08_00020	256 a.o.
A0A2A6Q112	<i>Escherichia coli</i>	462023	513	0.0	98.8%	DNX30_25590	256 a.o.
D3GYR3	<i>Escherichia coli O44:H18</i>	042	513	0.0	98.8%	EC042_3556	256 a.o.
Q32B70	<i>Shigella dysenteriae</i>	Sd197	513	0.0	98.8%	yrdA, SDY_3456	256 a.o.
A0A2S8DCY0	<i>Shigella dysenteriae</i>	BS979	513	0.0	98.8%	C5K18_09980	256 a.o.
B2U2P7	<i>Shigella boydii</i>	CDC 3083-94	511	0.0	98.8%	SbBS512_E3665	256 a.o.
A0A4V1DQZ1	<i>Escherichia coli O145:NM</i>	FWSEC 0002	511	0.0	98.4%	CCU01_002670	256 a.o.
A0AA36L182	<i>Escherichia coli O25b:H4-ST131</i>	EC958	508	0.0	97.3%	EC958_3673	256 a.o.
A0A5F1HUT1	<i>Escherichia sp. E1130</i>	not specified	498	1.00 E-177	95.7%	CQJ27_19625	256 a.o.
AAG58401.1	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	EDL933	530	0.0	100.00%	not specified	256 a.o.
EFN9619321.1	<i>Escherichia coli</i>	SMS-3-5	529	0.0	99.61%	yrdA	256 a.o.

Полученные данные свидетельствуют о том, что полноразмерная EcoSAγ является эволюционно консервативным белком, широко представленной среди штаммов *Escherichia* и *Shigella*, включая как комменсальные, так и патогенные линии. Вместе с тем прямые экспериментальные данные о её биологической значимости — влиянии на рост, адаптацию или вирулентность — отсутствуют.

3.4.2. Критерий 2. Физиологическая роль EcoSAγ

Некоторые ортологи EcoSAγ, рассмотренные выше, в базах данных аннотированы как белки, ассоциированные с мембраной. В связи с этим был проведён дополнительный анализ аминокислотной последовательности EcoSAγ для оценки возможной мембранной ассоциации данной изоформы.

Анализ аминокислотного состава выявил протяжённый гидрофобный участок в N-концевой области белка, что позволяет предположить якорную функцию данного домена. Затем, для проверки этой гипотезы использовали серверы предсказания мембранной топологии TOPCONS, OCTOPUS, SCAMPI, SPOCTOPUS, PolyPhobius и Philius. Результаты, полученные независимыми алгоритмами, указывают на наличие трансмембранного сегмента в N-концевой области белка в пределах остатков 20–45.

Более того, сервер PPM 3.0 так же идентифицировал предполагаемый трансмембранный участок в области остатков 12–41 с гидрофобной толщиной $42,4 \pm 1,9 \text{ \AA}$, свободной энергией $\Delta G = -64,8 \text{ ккал/моль}$ и углом наклона относительно нормали мембраны $3 \pm 2^\circ$, что соответствует устойчивой интеграции в липидный бислой (Приложение В, Рисунок П1). Профиль свободной энергии демонстрирует выраженный гидрофобный минимум в N-концевой области, тогда как для остальной части белка значения ΔG остаются положительными, что характерно для растворимого каталитического домена (Рисунок 28).

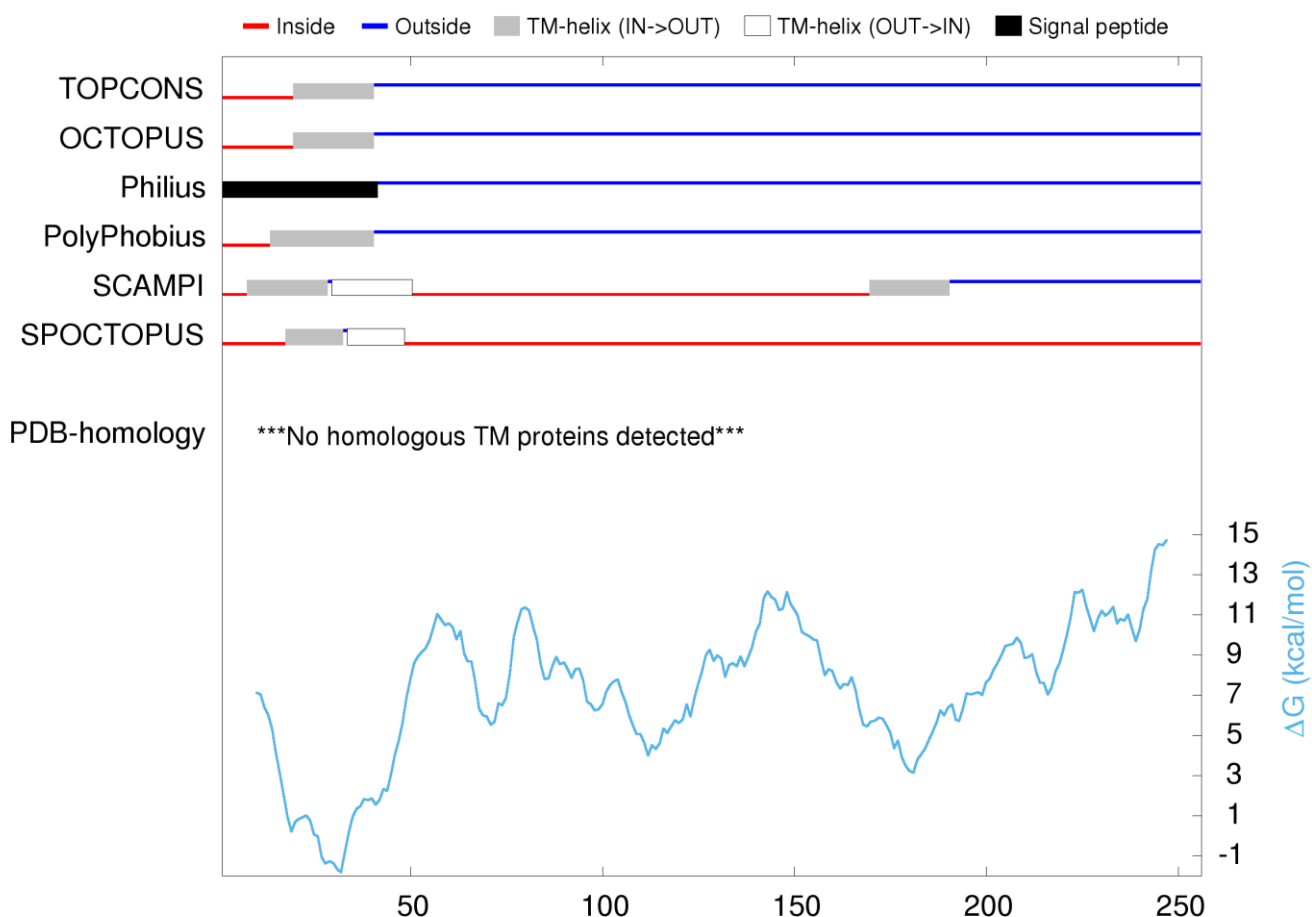


Рисунок 28. Предсказание трансмембранной топологии EcoCAγ (сервер TOPCONS). Верхняя панель: результаты алгоритмов TOPCONS, OCTOPUS, Philius, PolyPhobius, SCAMPI и SPOCTOPUS. Серые и белые прямоугольники соответствуют предполагаемым трансмембранным α -спиралям, чёрный участок - сигнальному пептиду, красные и синие линии - предполагаемой локализации участков белка с цитоплазматической и периплазматической стороны соответственно. Нижняя панель: профиль свободной энергии (ΔG) вдоль аминокислотной последовательности. Выраженный гидрофобный минимум в N-концевой области соответствует предполагаемому мембранному якорю белка.

Пять независимых запусков PPM 3.0 дали воспроизводимые значения глубины погружения и положения мембрано-ассоциированных участков. Однако предсказания ориентации каталитического домена разошлись: три модели указывали на его расположение со стороны цитоплазмы, а две со стороны периплазмы. Несмотря на преобладание первого варианта, однозначного вывода о

топологии сделать не представлялось возможным, в связи с чем были рассмотрены обе модели. В первой модели каталитический домен ориентирован в цитоплазму, что предполагает участие белка в регуляции внутриклеточного обмена $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ и бикарбонат-зависимых метаболических процессов. Во второй модели каталитический домен ориентирован в периплазматическом пространстве. В пользу второй модели свидетельствует анализ N-концевой последовательности MKCFTLSSQRRRI: гидрофобный участок расположен непосредственно после полярного N-конца и не содержит типичного сайта расщепления сигнального пептида, что характерно для сигнальных якорей. Применение правила положительного заряда (positive-inside rule) указывает на то, что остатки Lys¹¹ и Arg¹² вероятнее располагаются с цитоплазматической стороны мембраны, тогда как основной каталитический домен (остатки ~43–256) ориентирован в периплазму. Такая организация согласуется с предсказаниями TOPCONS и допускает участие EсoCA γ в регуляции pH и адаптации бактерии к изменениям условий внешней среды.

Прямые экспериментальные данные о субклеточной локализации белка отсутствуют, поэтому мембранная ассоциация EсoCA γ рассматривается далее, как *in silico*-гипотеза, определяющая направление дальнейшей экспериментальной проверки.

3.4.3. Критерий 3. Биохимическая достоверность EсoCA γ

Оценка достоверности данных *in vitro* показала, что для EсoCA γ опубликованы количественные кинетические параметры, свидетельствующие о высокой каталитической активности: $k_{\text{cat}} \approx 5,7 \times 10^5 \text{ c}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m \approx 6,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$. Активность измерена методом электрометрического титрования. Тем не менее интерпретация этих данных ограничена особенностями экспериментальных конструкций, использованных в опубликованных работах.

В работе, посвящённой укороченной форме YrdA, исследовалась модифицированная конструкция с заменой Arg6His и C-концевым His-тегом. Упомянутые модификации способны влиять на состояние активного центра и

каталитическую активность, вследствие чего низкий уровень активности YrdA не может быть однозначно отнесён к свойствам нативной укороченной изоформы. Для полноразмерной EсоСА γ также использовалась рекомбинантная форма, содержащая N-концевой His-тег и дополнительный водорастворимый пептид массой около 4 кДа. При этом предполагаемая мембранная ассоциация белка не контролировалась: в описании эксперимента отсутствуют сведения об условиях, позволяющих оценить состояние гидрофобного N-концевого домена (остатки ~12–42) в мембранном окружении, детергентах, липосомах или мембранных фракциях. Нельзя исключить, что дополнительный растворимый пептид в составе конструкции частично экранировал гидрофобный домен и тем самым влиял на наблюдаемую каталитическую активность.

Таким образом, с формальной точки зрения критерий биохимической достоверности для EсоСА γ может считаться выполненным, поскольку для неё получены количественные параметры активности и чувствительности к ингибиторам. Однако полученные данные не могут быть однозначно отнесены к мембранно-ассоциированной форме белка. Критерий следует оценивать как выполненный условно: каталитическая активность показана, но её соответствие физиологическому состоянию белка требует самостоятельной экспериментальной проверки.

3.4.4. Критерий 4. Структурная интерпретация EсоСА γ

До настоящей работы экспериментальные пространственные структуры и достоверные расчётные модели полноразмерной EсоСА γ отсутствовали. Для получения структурно интерпретируемой модели была построена модель гомотримера с использованием AlphaFold-Multimer. Выбор тримерной модели обусловлен биологически активной формой γ -СА: функционально активная форма данного класса ферментов является гомотимером, а каталитический центр формируется на границе субъединиц. Наилучшая модель характеризовалась значениями $pLDDT = 77,6$, $pTM = 0,751$ и $ipTM = 0,748$, что свидетельствует о

приемлемой достоверности глобальной укладки и межсубъединичных контактов (Рисунок 29).

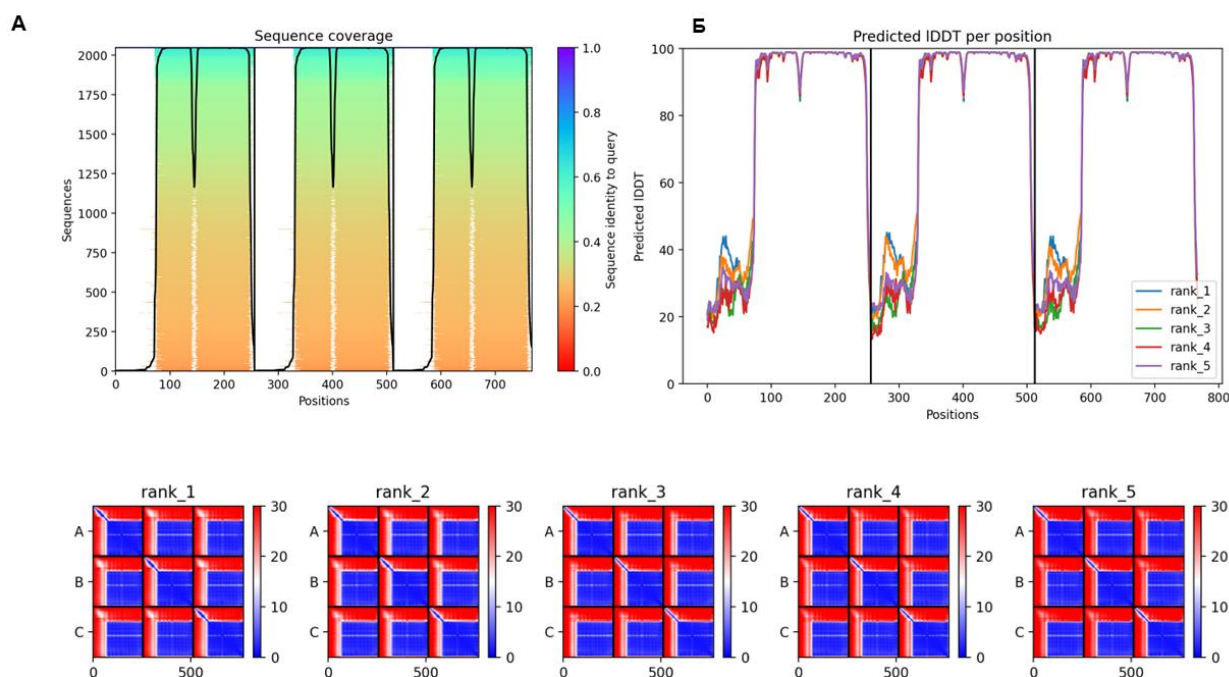


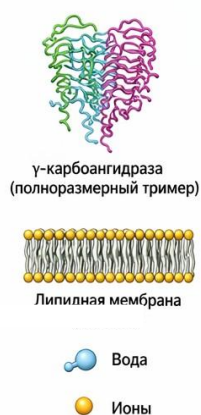
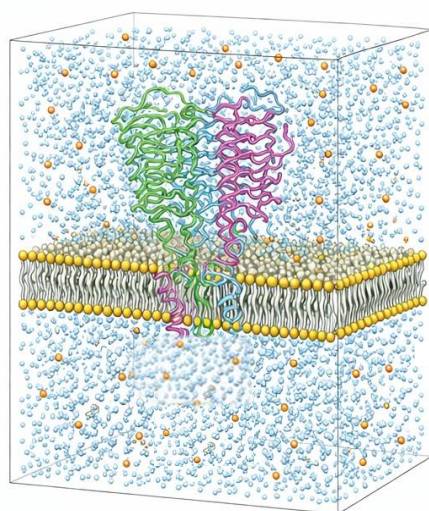
Рисунок 29. Оценка качества модели тримера EcsA γ , построенной с помощью AlphaFold-Multimer. (A) — множественное выравнивание последовательностей, использованное при моделировании; цветовая шкала отражает степень сходства гомологичных последовательностей с EcsA γ . (Б) — показатели достоверности предсказания для пяти ранжированных моделей (rank_1–rank_5) и карты контактов для каждой из них. Диагональные области карт соответствуют внутримолекулярным контактам мономера, внедиагональные — межмолекулярным контактам в тримере. Сходство карт между моделями свидетельствует о стабильной тримерной организации белка.

Анализ общей архитектуры модели показал сохранение типичной для γ -класса складки каталитического домена и наличие дополнительного N-концевого α -спирального домена, отсутствующего у укороченной формы YrdA. Затем проводили моделирование иона Zn^{2+} в активном центре модели на основании известных кристаллических структур γ -CA (PDB ID: 3TIO и 3TIS). Таким образом,

впервые была получена модель пространственной структуры полноразмерного гомотримера EсoCAγ, пригодная для анализа функции N-концевого домена.

Для дальнейшей оценки предполагаемой мембранной ассоциации EсoCAγ, выявленной на этапе анализа физиологической роли белка, были проведены молекулярно-динамические расчёты в двух модельных системах. Первая имитировала мембранное окружение: N-концевые α-спирали тримера частично погружены в липидный бислой состава PE:PG:CL = 75:20:5, характерного для грамотрицательных бактерий. Продолжительность расчёта составила 100 нс (три независимых повтора). Вторая система имитировала водный буфер, в котором были получены опубликованные биохимические данные; продолжительность расчёта составила 50 нс (три независимых повтора) (Рисунок 30).

Мембранная система



Водная система

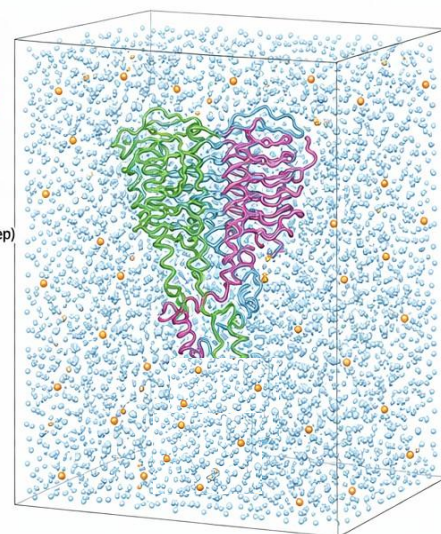


Рисунок 30. Схематическое представление модельных систем для молекулярно-динамических симуляций EсoCAγ. Слева показана мембранная система, в которой N-концевые α-спирали тримера частично погружены в липидный бислой. Справа представлена водная система, моделирующая буферные условия *in vitro* [127]. Обе системы включали водное окружение и ионы.

В мембранной системе EсoCAγ проявляет высокую структурную стабильность. Радиус гирации остаётся постоянным на уровне $3,0 \pm 0,05$ нм, как и площадь поверхности, доступной растворителю (280 ± 10 нм²). N-концевые α-спирали сохраняют стартовое положение в бислое. Не наблюдается диссоциации тримера и/или белок-мембранного комплекса (Рисунок 31). Дополнительно, кластерный анализ так же показал, что более 85% траектории описывается двумя и более доминирующими конформационными состояниями, что указывает на низкую конформационную подвижность белка в мембранном окружении (Рисунок 33-34). Напротив, в водной системе наблюдается компактизация структуры: радиус гирации снижается с 3,6 до 3,4 нм, площадь поверхности, доступной растворителю уменьшается с 410 до 360 нм² (Рисунок 31). Эти изменения связаны с перестройкой N-концевого гидрофобного домена, который стремится минимизировать контакт с водным окружением. Для данного участка (12–42 а.о.) зафиксировано снижение локального радиуса гирации с 1,8 до 1,6 нм и SASA с 100 до 75 нм² (Рисунок 32). Кластерный анализ также фиксирует большее число конформационных состояний по сравнению с мембранной системой, что указывает на повышенную подвижность N-концевого α-спирального домена в отсутствие мембранного окружения (Рисунок 33, 35).

При анализе траекторий в обеих системах каталитический домен остается стабильным на протяжении всей симуляции. Отсутствуют значимые конформационные изменения, или перестройки в области активного центра. Это указывает на отсутствие прямого влияния N-концевого домена на структурную организацию активного центра и, вероятно, на каталитическую функцию фермента. Следовательно, полученные данные подтверждают гипотезу о том, что N-концевой домен EсoCAγ выполняет преимущественно якорную функцию, обеспечивая мембранную ассоциацию белка.

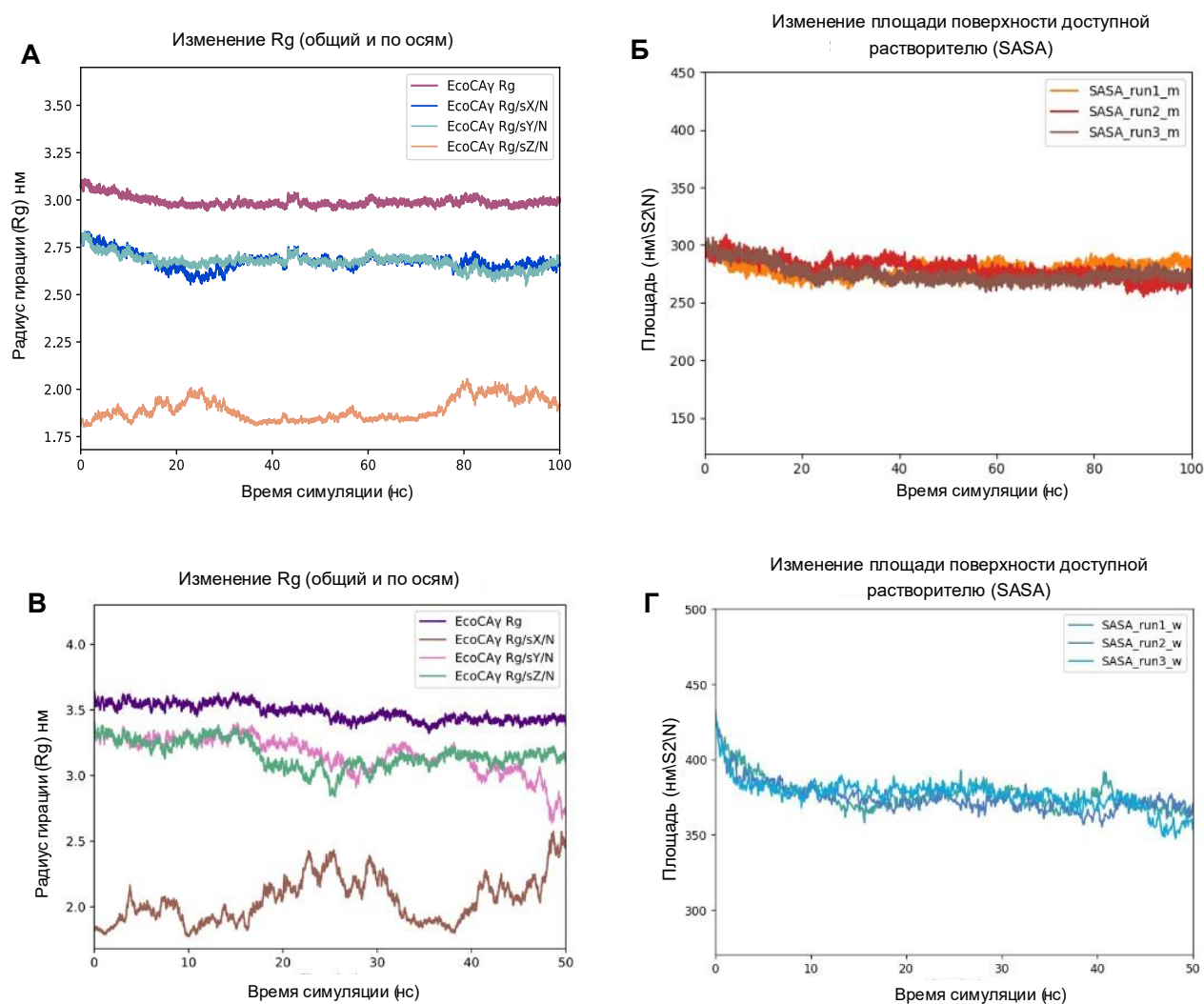


Рисунок 31. Анализ траекторий. (А) Изменения Rg EcoCAγ в мембранной системе (100 нс): показаны общий Rg и компоненты по осям (RgX, RgY, RgZ). (Б) Изменения SASA EcoCAγ в мембранной системе (100 нс) для трёх независимых траекторий. (В) Изменения Rg EcoCAγ в водной системе (50 нс) и компоненты по осям (RgX, RgY, RgZ). (Г) Изменения SASA EcoCAγ в водной системе (50 нс) для трёх независимых траекторий.

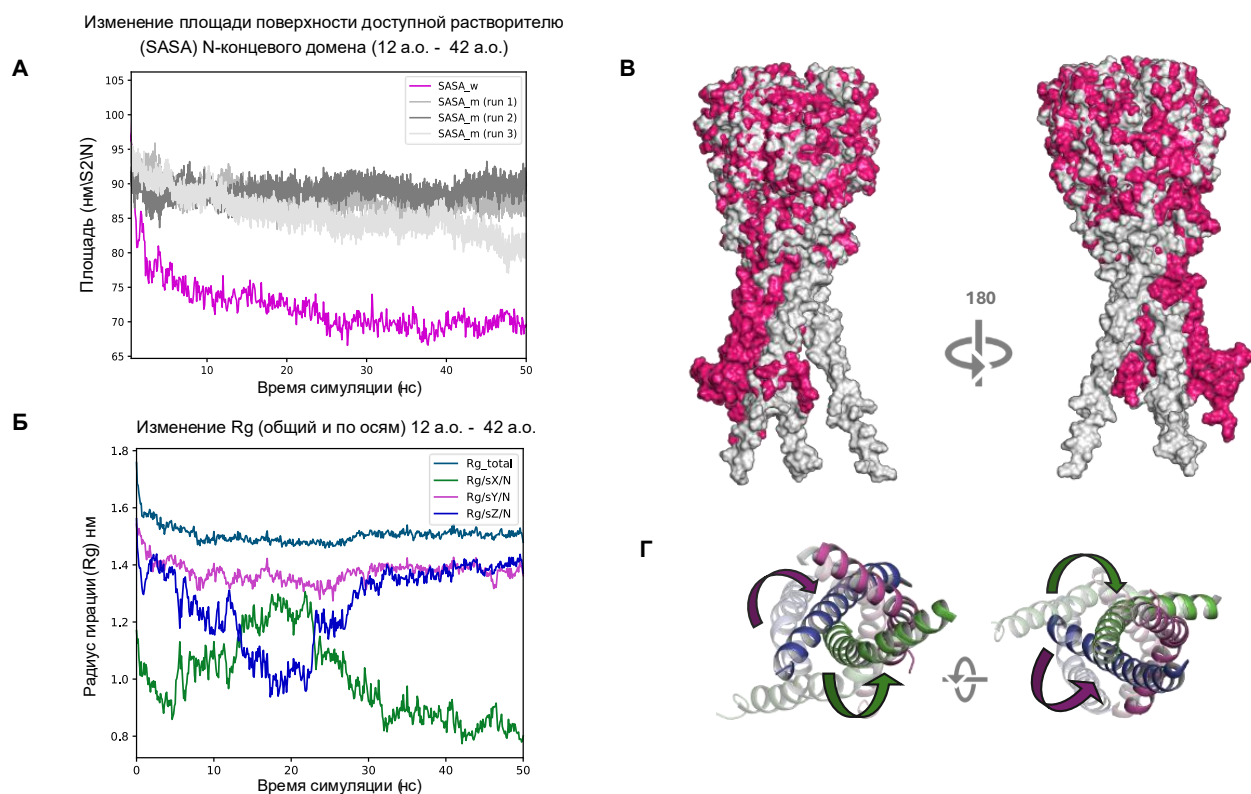


Рисунок 32. Конформационное поведение N-концевого α -спирального домена (остатки 12–42) EcoCA γ в водной модельной системе. (А) Изменения SASA N-концевого домена в водной (пурпурный) и мембранной (серый) системах. (Б) Изменения Rg N-концевого домена в водной системе: общий и по главным осям. (В) Изменение общей поверхности тримера EcoCA γ : кадр 0 нс траектории (серый) и кадр 50 нс (пурпурный). (Г) Компактизация N-концевых α -спиралей в водной модельной системе. Цепи тримера показаны разными цветами. Бледные спирали соответствуют исходной структуре (0 нс), более насыщенные — положение после 50 нс; стрелками показано направление смещения спиралей.

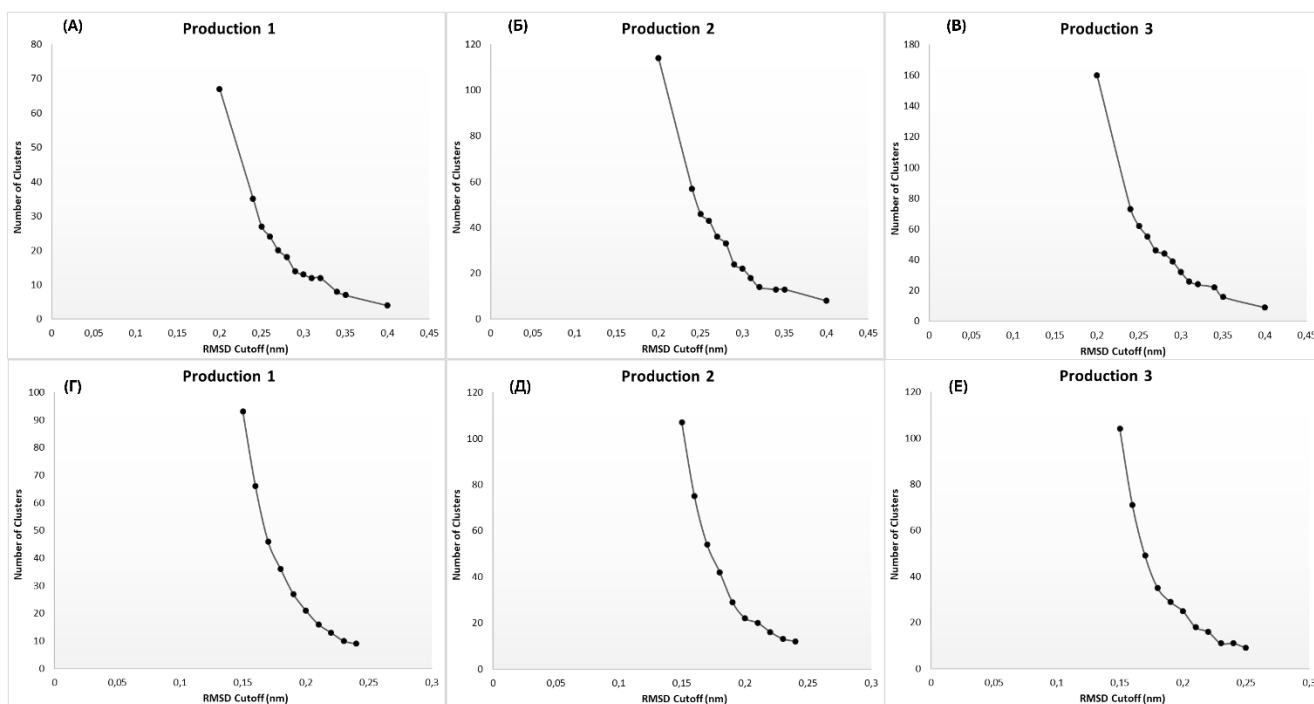


Рисунок 33. Графики, демонстрирующие зависимость числа кластеров от порогового значения RMSD. А-В для ЕсоСАγ в водной системе. Г-Д для ЕсоСАγ в мембранной системе. Справа: наиболее часто встречающиеся (репрезентативные) модели ЕсоСАγ внутри кластеров для мембранной (сверху) и водной (снизу) систем. Обозначение C1 соответствует номеру кластера, N - число моделей, входящих в кластер.

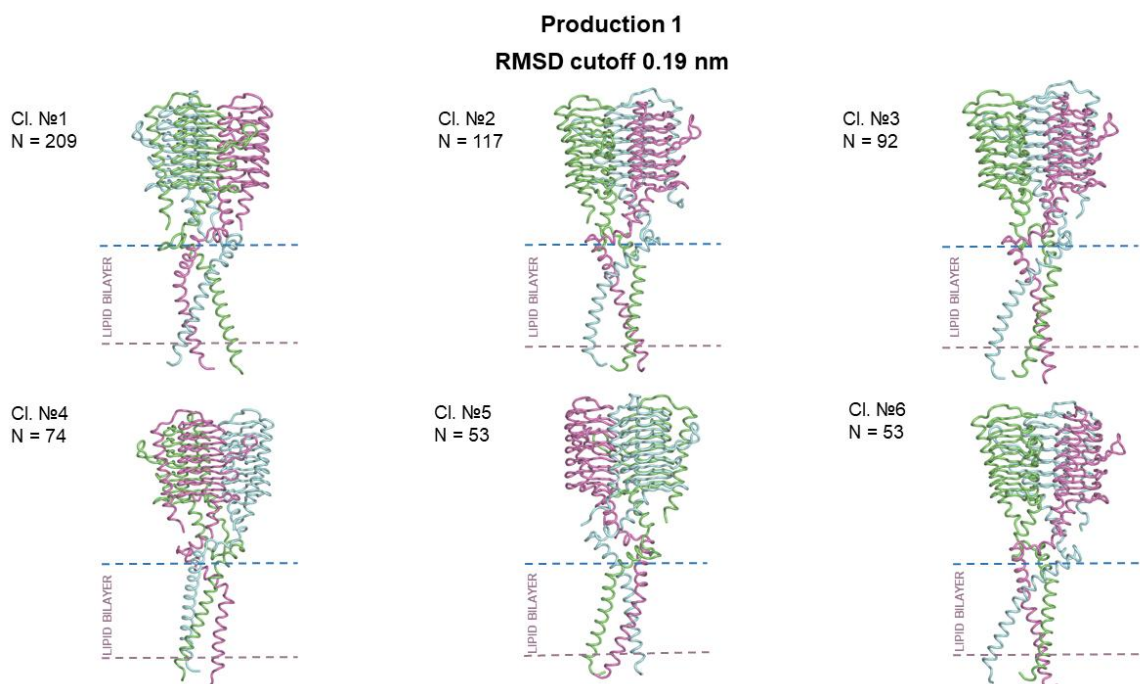


Рисунок 34. Репрезентативные модели EcoSAγ внутри кластеров для мембранной системы. Обозначение Cl соответствует номеру кластера, N - число моделей, входящих в кластер. Модели представлены для первого запуска длительной траектории. Результаты для второго и третьего запуска показаны в Приложении Г (Рисунок П2-П3).

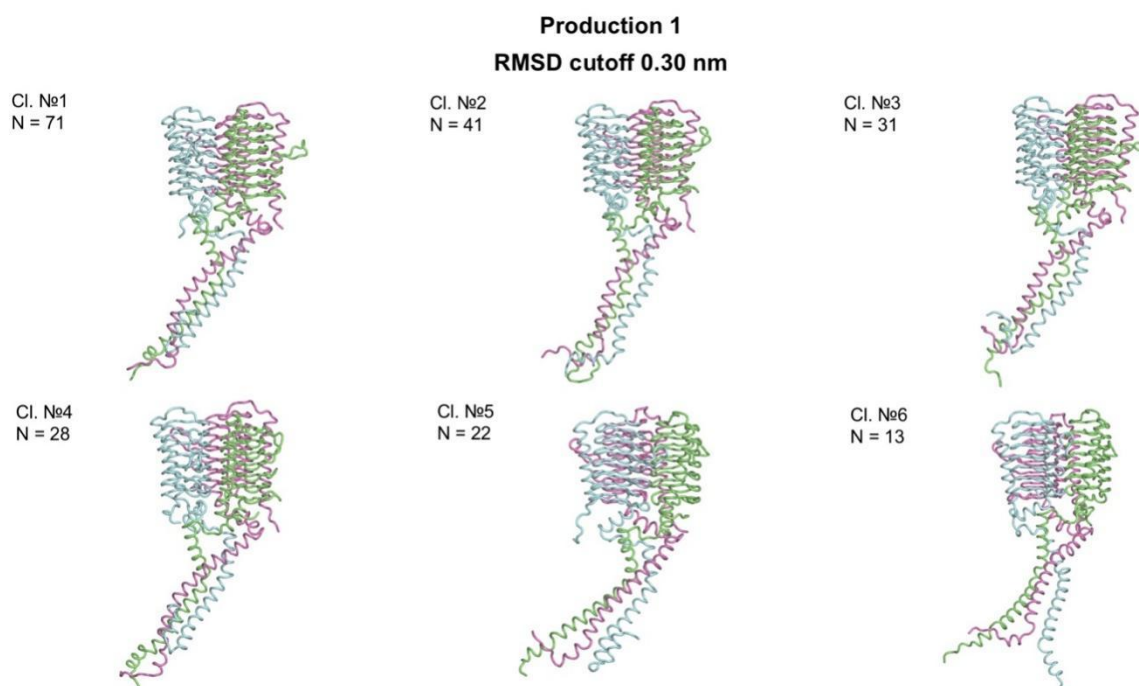


Рисунок 35. Репрезентативные модели EcoSAγ внутри кластеров для водной системы. Обозначение Cl соответствует номеру кластера, N - число моделей,

входящих в кластер. Модели представлены для первого запуска длительной траектории. Результаты для второго и третьего запуска показаны в Приложении Г (Рисунок П4-П5).

3.4.5. Итог по EсоСАγ

Генеративный режим работы системы критериев позволил пересмотреть ряд вопросов, ограничивающих практическое использование EсоСАγ, как терапевтической мишени. Биоинформатический анализ подтвердил, что изоформа EсоСАγ широко представлена в геномах представителей родов *Escherichia* и *Shigella*, включая патогенные линии, что повышает её значимость как потенциальной мишени. Часть идентифицированных по результатам BLAST ортологов целевого белка аннотирована как мембранные белки. Аналогичный результат дают независимые алгоритмы предсказания мембранной ассоциации фермента. Это позволило выдвинуть соответствующую гипотезу уже на раннем этапе исследования, что и составляет содержание генеративного режима. Результаты молекулярно-динамических расчётов с данной гипотезой согласуются: N-концевой домен EсоСАγ, по-видимому, выполняет функцию мембранного якоря. Мембранная ассоциация фермента является существенным условием при разработке соединений, поскольку требования к ингибитору смещаются в сторону липофильности и накопления в околосмембранном окружении или периплазме, а не в цитоплазме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Понимание молекулярных механизмов функционирования карбоангидраз является необходимым условием их практического применения в качестве терапевтических мишеней. Несмотря на признанный потенциал α -, β - и γ -СА для разработки противоопухолевых, противоглаукомных и антибактериальных препаратов, накопленные к настоящему времени данные по этим ферментам носят неоднородный характер.

Так, для α -СА долгое время основной подход к дизайну ингибиторов сводился к модификации хвостовой части молекулы. Считалось, что решающий вклад в сродство и селективность вносят уникальные контакты хвоста лиганда с переменными остатками у входа в активный центр. Однако структурный анализ, проведенный в данной работе, показал, что немаловажную роль играет стерическая комплементарность молекулы лиганда полости активного центра, то есть принцип «ключ — замок». Для 8V8 связывание обеспечивается гидрофобными взаимодействиями и соответствием формы соединения консервативной части полости, в формировании которой участвуют в том числе переменные остатки. В случае соединения 8V5 показано, что в связывании задействован переменный остаток Phe131, образующий контакт с хвостовой частью лиганда — морфолиновым кольцом. У других терапевтических мишеней, изоформ α -СА IX и α -СА XII, данная позиция представлена алифатическими остатками. При этом различие в сродстве 8V5 к ним по сравнению с α -СА II в три порядка не объясняется только силой самого СН– π -взаимодействия. Объемная боковая группа Phe131 выполняет здесь две функции одновременно: формирует геометрию полости и образует контакт с морфолиновым кольцом. Замена Phe131 на алифатический остаток устраняет обе, что и приводит к снижению сродства. Полученные в настоящей работе данные показывают, что концепция дизайна ингибиторов по схеме «голова — линкер — хвост» должна учитывать не только возможные взаимодействия хвостовой части лиганда с переменными остатками, но и соответствие формы молекулы лиганда форме полости активного центра.

Иное положение наблюдается для β -СА. Анализ и систематизация данных поля по β -СА патогенов позволили не только провести классификацию изоформ по группам приоритетности терапевтических мишеней, но и выяснить, какие именно существуют ограничения, препятствующие использованию этих изоформ в практическом применении. Из девяти оценённых изоформ к приоритетным мишеням отнесена только psCA1 *P. aeruginosa* (группа В), остальные классифицированы как контекстуальные (группа С) или высокорисковые (группа D). Ни для одной из изоформ нет ингибитора с профилем селективности, достаточным для клинического применения. Все известные протестированные соединения сохраняют сопоставимое или более высокое сродство к α -СА человека.

Связано это в первую очередь с отсутствием понимания структурных механизмов работы активного центра фермента. Поскольку β -класс начали изучать вслед за α -классом, концепция ингибиторов также была перенята от α -СА. Сами же представления о работе активного центра β -СА опираются на гипотезу рН-зависимого переключения, предложенную более двадцати лет назад для одной изоформы mtCA2. Впоследствии её начали переносить на β -СА других организмов и цитировать как установленный механизм, хотя прямых подтверждений взаимосвязи олигомерной формы фермента и конформации активного центра нет. В данной работе показано, что обе конформации активного центра остаются стабильными вне зависимости от олигомерной формы фермента. Это означает, что обе конформации и обе олигомерные формы могут быть использованы для формулирования новых концепций разработки ингибиторов, исходящих из особенностей самого β -класса, а не из механизма связывания сульфонамидов с α -СА. В частности, закрытая конформация задаёт принципиально иной сайт связывания, без координации с металлом, и не имеющий аналогов у α -изоформ человека, а построенный на ней каркас соединения возможно позволит избежать кросс-таргетного воздействия на α -изоформы человека.

Для γ -СА работа началась с уточнения информации о самом объекте исследования. Анализ штаммовой принадлежности показал, что полноразмерная EsoCA γ (256

а.о.) широко представлена в геномах патогенных и комменсальных штаммов *Escherichia* и *Shigella* с идентичностью 95–100 %, тогда как в лабораторном штамме *E. coli* K-12 этот белок отсутствует. В его геноме присутствует лишь укороченная форма YrdA (184 а.о.), лишённая N-концевого домена при полной идентичности каталитического домена. Проведённые расчёты позволяют заключить, что N-концевой домен EсoCAγ выполняет преимущественно якорную функцию, обеспечивая ассоциацию белка с мембраной. Влияния N-концевого домена на активный центр фермента в ходе симуляций выявлено не было.

Вероятная мембранная ассоциация фермента, показанная впервые, предполагает иной подход к разработке ингибиторов этого класса. Соединение должно достигать фермента не в цитоплазме, а вблизи мембраны или периплазме, что предъявляет иные требования к его липофильности и накоплению. С осторожностью следует относиться и к опубликованным константам ингибирования. Все они получены на модифицированной конструкции, где ни нативное окружение фермента, ни его ориентация относительно мембраны не воспроизводятся.

К настоящему времени разработка ингибиторов карбоангидраз опирается преимущественно на принципы, установленные для α-класса, и на сульфонамидный каркас, перенесённый на остальные классы вместе с ними. Проведённое исследование показывает, что за пределами такого подхода остаётся существенная часть структурного разнообразия этих ферментов — форма связывающей полости, устойчивость альтернативных конформаций активного центра, олигомерная организация и локализация белка в клетке. С учётом этих признаков концепции дизайна должны формулироваться отдельно для каждого класса, без переноса готовых решений между ними. Насколько такие концепции реализуемы на практике, покажет дальнейшая работа.

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 EсоСА γ формирует гидрофобный α -спиральный домен, который, по всей видимости, выполняет преимущественно структурную функцию, обеспечивая мембранную ассоциацию фермента. Это позволяет рассматривать EсоСА γ как мембраносвязанную терапевтическую мишень и задаёт иные требования к физико-химическим свойствам её ингибиторов по сравнению с соединениями для цитоплазматических изоформ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СА — карбоангидраза/карбоангидразы

α -СА — α -карбоангидраза / α -карбоангидразы

β -СА — β -карбоангидраза / β -карбоангидразы

γ -СА — γ -карбоангидраза / γ -карбоангидразы

α -hCA — α -карбоангидраза человека

α -bCA — α -карбоангидраза быка

EcoCA γ — γ -изоформа карбоангидразы *Escherichia coli* (256 а.о.)

YrdA — γ -изоформа карбоангидразы *Escherichia coli* (184 а.о.)

mtCA2 — β -карбоангидраза 2 *Mycobacterium tuberculosis*

RMSD — среднеквадратичное отклонение координат атомов (Root Mean Square Deviation)

МД — молекулярно-динамические расчёты

E. coli — *Escherichia coli*

M. tuberculosis — *Mycobacterium tuberculosis*

V. cholerae — *Vibrio cholerae*

P. aeruginosa — *Pseudomonas aeruginosa*

S. pneumoniae — *Streptococcus pneumoniae*

а.о. — аминокислотный остаток

ДМСО — диметилсульфоксид

ДСН — додецилсульфат натрия

ИПТГ — изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

ПААГ — полиакриламидный гель

ПМСФ — фенилметансульфонилфторид

ТЕМЕД — N, N, N', N' – тетраметилэтилендиамин

PDB — Protein Data Bank

UniProt — Universal Protein Resource

Zn²⁺ — ион цинка

CO₂ — диоксид углерода

HCO₃⁻ — бикарбонат-ион

pH — показатель кислотности среды

HIF-1 α — гипоксия-индуцируемый фактор 1 α

GPI — гликозилфосфатидилинозитольный якорь

K_i — константа ингибирования

K_{cat} — число оборотов фермента

апо-форма — форма белка без связанного лиганда

BSA — площадь поверхности, экранированной от растворителя при образовании межсубъединичного интерфейса (Buried Solvent-Accessible Surface Area)

COM — расстояние между центрами масс субъединиц (Center Of Mass distance)

LINCS — алгоритм ограничения связей с участием водорода в МД-расчётах (Linear Constraint Solver)

PME — метод суммирования по Эвальду для расчёта дальнодействующих электростатических взаимодействий (Particle Mesh Ewald)

RMSF — среднеквадратичная флуктуация координат атомов (Root Mean Square Fluctuation)

NVT-ансамбль — статистический ансамбль с постоянным числом частиц, объёмом и температурой

NPT-ансамбль — статистический ансамбль с постоянным числом частиц, давлением и температурой

СПИСОК ТЕРМИНОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЙ

Терапевтическая мишень — биологическая макромолекула, как правило белок или ген, с которой взаимодействует лекарственное соединение, изменяя её активность и тем самым оказывая терапевтически значимый эффект.

Ингибитор карбоангидразы — соединение, снижающее каталитическую активность карбоангидразы посредством взаимодействия с её активным центром.

Селективность ингибитора — это способность соединения избирательно воздействовать на определённую изоформу фермента.

Константа ингибирования (K_i) — равновесная константа диссоциации комплекса фермент–ингибитор; чем меньше значение K_i , тем выше сродство ингибитора к ферменту.

Валидация терапевтической мишени — комплекс экспериментальных и теоретических подходов, последовательно подтверждающих биологическую значимость мишени, её роль в патогенезе, причинно-следственную связь между подавлением её активности и наблюдаемым фенотипическим эффектом, а также принципиальную возможность избирательного фармакологического воздействия.

Генетическая значимость — подтверждение незаменимости исследуемого гена для жизнедеятельности организма или развития патологического процесса.

Биохимическая достоверность — соответствие экспериментально полученных данных о каталитической активности фермента условиям его предполагаемого функционирования *in vivo*, включая pH среды, используемые конструкции рекомбинантного белка и природу модификаций.

Структурная интерпретация — анализ пространственной структуры белка с целью объяснения механизма его функционирования, организации активного центра и молекулярных детерминант взаимодействия с лигандами.

Молекулярная динамика — метод компьютерного моделирования, позволяющий исследовать движение атомов и молекул во времени на основе законов классической механики с применением эмпирических силовых полей. Используется для оценки стабильности белок-лигандных комплексов и конформационной подвижности белков.

Площадь поверхности, экранированной от растворителя (BSA) — величина, характеризующая плотность межсубъединичного контакта; вычисляется как разность между суммой площадей изолированных цепей и площадью пары в комплексе. Снижение BSA указывает на ослабление или переориентацию интерфейса.

Межсубъединичный интерфейс — область контакта между субъединицами белкового комплекса, определяемая как совокупность остатков, имеющих хотя бы один тяжёлый атом в пределах заданного расстояния от соседней субъединицы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mills, G. A. The kinetics of isotopic exchange between carbon dioxide, bicarbonate ion, carbonate ion and water / G. A. Mills, H. C. Urey // *Journal of the American Chemical Society*. — 1940. — № 62. — С. 1019–1026.
2. Frost, S. C. Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications / S. C. Frost, R. McKenna. — 1. — Dordrecht : Springer, 2014. — 430 с.
3. Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors and their potential in a range of therapeutic areas / C. T. Supuran // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. — 2018. — № 28. — С. 709–712.
4. Supuran, C. T. Applications of carbonic anhydrase inhibitors in renal and central nervous system diseases / C. T. Supuran // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. — 2018. — С. 713–721.
5. Supuran CT (2018c). Carbonic anhydrase inhibitors as emerging agents for the treatment and imaging of hypoxic tumors. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 27, 963–970.
6. Akocak, S. Activation of α -, β -, γ -, δ -, ζ - and η -class of carbonic anhydrases with amines and amino acids: a review / S. Akocak, C. T. Supuran // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. — 2019. — № 34. — С. 1652–1659.
7. Supuran, C. T. The η -class carbonic anhydrases as drug targets for antimalarial agents / C. T. Supuran, C. Capasso // *Expert Opin Ther Targets*. — 2015. — № 19. — С. 551–563.
8. Sjöblom, B. Structural study of X-ray induced activation of carbonic anhydrase / B. Sjöblom, M. Polentarutti, K. Djinovic-Carugo // *Proc Natl Acad Sci U S A*. — 2009. — № 106(26). — С. 10609–13.
9. Lindskog S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther*. 1997;74(1):1–20. doi: 10.1016/s0163-7258(96)00198-2. PMID: 9336012.
10. Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein-ligand binding / V. M. Krishnamurthy, G. K. Kaufman, A. R. Urbach [и др.] // *Chemical Reviews*. — 2008. — № 108(3). — С. 946–1051.
11. Catalytic mechanism of α -class carbonic anhydrases: CO₂ hydration and proton transfer / C. D. Boone, M. Pinard, R. McKenna, D. Silverman // *Subcellular Biochemistry*. — 2014. — № 75. — С. 31–52.
12. α -CAs from Photosynthetic Organisms / E. Langella, F. A. Di, V. Alterio [и др.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — № 19. — С. 12045.
13. Capasso, C. An overview of the alpha-, beta- and gamma-carbonic anhydrases from Bacteria: can bacterial carbonic anhydrases shed new light on evolution of bacteria? / C. Capasso, CT Supuran // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. — 2015. — № 30(2). — С. 325–32.

14. Capasso, C. Bacterial, fungal and protozoan carbonic anhydrases as drug targets / C. Capasso, C. T. Supuran // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. — 2015. — № 19. — C. 1689–1704.
15. Supuran, C. T. Biomedical applications of prokaryotic carbonic anhydrases / C. T. Supuran, C. Capasso // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. — 2018. — № 28. — C. 745–754.
16. Supuran, C. T. An overview of the bacterial carbonic anhydrases / C. T. Supuran, C. Capasso // *Metabolites*. — 2017. — № 7. — C. 56.
17. Del, P. S. Discovery of a new family of carbonic anhydrases in *Plasmodium falciparum* / P. S. Del, D. Vullo, GM et al Fisher // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. — 2014. — № 24. — C. 4389–4396.
18. Jensen, EL A new widespread subclass of carbonic anhydrase in marine phytoplankton / EL Jensen, R. Clement, A. Kosta // *International Society for Microbial Ecology Journal*. — 2019. — № 13. — C. 2094-2106.
19. Aspatwar, A. Carbonic anhydrases in metazoan model organisms / A. Aspatwar, MEE Tolvanen, H et al Barker // *Physiological Reviews*. — 2022. — C. 1327–1383.
20. Zimmerman, S. A. Inhibition of the archaeal beta-class (Cab) and gamma-class (Cam) carbonic anhydrases / S. A. Zimmerman, J. G. Ferry, C. T. Supuran // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. — 2007. — № 7(9). — C. 901-8.
21. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? / V. Alterio, F. A. Di, K. D'Ambrosio [и др.] // *Chemical Reviews*. — 2012. — № 8. — C. 4421-68.
22. Ismail, I. S. The role of carbonic anhydrase in hepatic glucose production / I. S. Ismail // *Current Diabetes Reviews*. — 2018. — № 14. — C. 108–112.
23. Antiglaucoma carbonic anhydrase inhibitors: a patent review / E. Masini, F. Carta, A. Scozzafava, C. T. Supuran // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. — 2013. — № 23. — C. 705–716.
24. D'Ambrosio, K. Human Carbonic Anhydrases: Catalytic Properties, Structural Features, and Tissue Distribution / K. D'Ambrosio, S. G. De, C. T. Supuran // *Carbonic Anhydrases as Biocatalysts*. — Amsterdam : Elsevier, 2015. — C. 17.
25. Antiglaucoma carbonic anhydrase inhibitors: a patent review / E. Masini, F. Carta, A. Scozzafava, C. T. Supuran // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. — 2013. — № 23. — C. 705–716.
26. Modern methods of diagnostics and monitoring of glaucoma / V. P. Elichev, S. Y. Petrov, I. V. Kozlova [и др.] // *National Journal Glaucoma*. — 2015. — № 14. — C. 72–79.

27. Antiglaucoma carbonic anhydrase inhibitors: a patent review / E. Masini, F. Carta, A. Scozzafava, C. T. Supuran // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. — 2013. — № 23. — С. 705-716.
28. Modern methods of diagnostics and monitoring of glaucoma / V. P. Elichev, S. Y. Petrov, I. V. Kozlova [и др.] // *National Journal Glaucoma*. — 2015. — № 14. — С. 72–79.
29. Tombran-Tink, J. Mechanisms of the Glaucomas / J. Tombran-Tink, C. J. Barnstable, M. B. Shields. — New York : Humana Press, 2008. — 198 с .
30. Yoshida, T. Intraocular pressure-lowering effects of ripasudil / T. Yoshida, S. Yoshimoto, T et al Nomura // *Scientific Reports*. — 2023. — № 13. — С. 22888.
31. Cyclodextrin-based formulation of carbonic anhydrase inhibitors / P. Jansook, H. M. Hnin, T. Loftsson, E. Stefánsson // *International Journal of Pharmaceutics*. — 2021. — № 606. — С. 120955.
32. Brunton, L. L. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics / L. L. Brunton, B. A. Chabner, R. Hilal-Dandan. — 13th ed. — New York : McGraw-Hill, 2018. — 1808 с .
33. Comparative Effectiveness of First-Line Medications for Primary Open-Angle Glaucoma: A Systematic Review and Network Meta-analysis / T. Li, K. Lindsley, B. Rouse [и др.] // *Ophthalmology*. — 2016. — № 1. — С. 129–140.
34. Harasymowycz, P. Short-term efficacy of latanoprostene bunod / P. Harasymowycz, C. Royer, A. X. Cui // *The British Journal of Ophthalmology*. — 2022. — № 106. — С. 640–647.
35. Scozzafava, A. Glaucoma and the Applications of Carbonic Anhydrase Inhibitors / A. Scozzafava, C. T. Supuran // *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*. — Dordrecht : Springer, 2014.
36. A short, strong hydrogen bond in the active site of human carbonic anhydrase II / B. S. Avvaru, C. U. Kim, K. H. Sippel [и др.] // *Biochemistry*. — 2010. — № 49(2). — С. 249-51.
37. Pinard, M. A. Probing the surface of human carbonic anhydrase for clues towards the design of isoform specific inhibitors / M. A. Pinard, B. Mahon, R. McKenna // *BioMed Research International*. — 2015. — С. 453543.
38. Thylakoid luminal θ -carbonic anhydrase critical for growth and photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* / S. Kikutani, K. Nakajima, C. Nagasato [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2016. — № 35. — С. 9828–9833.
39. Carbonic Anhydrase Inhibitors and Epilepsy: State of the Art and Future Perspectives / L. Ciccone, C. Cerri, S. Nencetti, E. Orlandini // *Molecules*. — 2021. — № 26(21). — С. 6380.

40. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the zinc and cobalt gamma-class enzyme from the archaeon *Methanosarcina thermophila* with anions / A. Innocenti, S. Zimmerman, J. G. Ferry [и др.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. — 2004. — № 1. — С. 3327-3331.
41. Maren, TH A study of renal carbonic anhydrase / TH Maren, AC Ellison // *Molecular Pharmacology*. — 1967. — № 3(6). — С. 503-8.
42. Supuran, C. T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators / C. T. Supuran // *Nat Rev Drug Discov*. — 2008. — № 2. — С. 168-81.
43. Sugrue, M. F. Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors / M. F. Sugrue // *Progress in Retinal and Eye Research*. — 2000. — № 1. — С. 87-112.
44. Supuran, C. T. How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? / C. T. Supuran // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. — 2015. — № 31. — С. 345–360.
45. Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors and their potential in a range of therapeutic areas / C. T. Supuran // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. — 2018. — № 10. — С. 709-712.
46. A decade of tail-approach based design of selective as well as potent tumor associated carbonic anhydrase inhibitors / A. Kumar, K. Siwach, C. T. Supuran, P. K. Sharma // *Journal of Bioorganic Chemistry*. — 2022. — № 126. — С. 105920.
47. Pegylation approach applied to erlotinib-carbonic anhydrase inhibitors hybrids towards anticancer agents / S. Filiberti, G. Renzi, F. Carta [и др.] // *RSC Medicinal Chemistry*. — 2025. — № 9. — С. 4316-4339.
48. A Phase 1 Study of SLC-0111, a Novel Inhibitor of Carbonic Anhydrase IX, in Patients With Advanced Solid Tumors / P. C. McDonald, S. Chia, P. L. Bedard [и др.] // *American Journal of Clinical Oncology*. — 2020. — № 7. — С. 484-490.
49. Supuran, C. T. Experimental Carbonic Anhydrase Inhibitors for the Treatment of Hypoxic Tumors / C. T. Supuran // *Journal of Experimental Pharmacology*. — 2020. — № 12. — С. 603-617.
50. Aromatic Sulfonamides including a Sulfonic Acid Tail: New Membrane Impermeant Carbonic Anhydrase Inhibitors for Targeting Selectively the Cancer-Associated Isoforms / S. Giovannuzzi, M. D'Ambrosio, C. Luceri [и др.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2021. — № 23(1). — С. 461.
51. Design and synthesis of some new benzoylthioureido benzenesulfonamide derivatives and their analogues as carbonic anhydrase inhibitors / K. H. Oudah, W. R. Mahmoud, F. M. Awadallah [и др.] // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. — 2023. — № 38(1). — С. 12-23.

52. The three-tails approach as a new strategy to improve selectivity of action of sulphonamide inhibitors against tumour-associated carbonic anhydrase IX and XII / A. Bonardi, S. Bua, J. Combs [и др.] // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. — 2022. — № 1. — С. 930-939.
53. Novel benzenesulfonamides containing a dual triazole moiety with selective carbonic anhydrase inhibition and anticancer activity / A. Buza, C. Türkeş, M. Arslan [и др.] // *RSC Medicinal Chemistry*. — 2024. — № 16(1). — С. 324–45.
54. Isocoumarins incorporating chalcone moieties act as isoform selective tumor-associated carbonic anhydrase inhibitors / M. Onyilmaz, M. Koca, A. Ammara [и др.] // *Future Medicinal Chemistry*. — 2024. — № 13. — С. 1347-1355.
55. 1,3-Oxazole-based selective picomolar inhibitors of cytosolic human carbonic anhydrase II alleviate ocular hypertension in rabbits: Potency is supported by X-ray crystallography of two leads / M. Ferraroni, L. Lucarini, E. Masini [и др.] // *Bioorganic & medicinal chemistry*. — 2017. — № 17. — С. 4560–4565.
56. High-resolution structure of human carbonic anhydrase II complexed with acetazolamide reveals insights into inhibitor drug design / K. H. Sippel, A. H. Robbins, J. Domsic [и др.] // *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*. — 2009. — № 65(Pt 10). — С. 992-5.
57. A novel class for carbonic anhydrases inhibitors and evaluation of their non-zinc binding / B. Kuzu, M. Tan, I. Gülçin, N. Menges // *Archiv der Pharmazie*. — 2021. — № 354(10). — С. e2100188.
58. Ismail, I. S. The role of carbonic anhydrase in hepatic glucose production / I. S. Ismail // *Current Diabetes Reviews*. — 2018. — № 14. — С. 108–112.
59. Sulfonamide Inhibitors of Human Carbonic Anhydrases Designed through a Three-Tails Approach: Improving Ligand/Isoform Matching and Selectivity of Action / A. Bonardi, A. Nocentini, S. Bua, al et // *Journal of Medicinal Chemistry*. — 2020. — № 63(13). — С. 7422-7444.
60. Liljas, A. Crystal structure of human carbonic anhydrase C / A. Liljas, K. K. Kannan, P. C. Bergström // *Nature: New biology*. — 1972. — № 57. — С. 131-137.
61. Eriksson, A. E. Structure of human CA II / A. E. Eriksson, T. A. Jones, A. Liljas // *Proteins*. — 1988. — № 4. — С. 274–282.
62. Christianson, D. W. Catalysis by metal-activated hydroxide / D. W. Christianson, J. D. Cox // *Annual Review of Biochemistry*. — 1999. — № 68. — С. 33–57.

63. Neish, A. C. Studies on chloroplasts: Their chemical composition and the distribution of certain metabolites between the chloroplasts and the remainder of the leaf / A. C. Neish // *Biochemical Journal*. — 1939. — № 33(3). — С. 300-8.
64. VEITCH, F. Carbonic Anhydrase in Bacteria / F. VEITCH, L. BLANKENSHIP // *Nature*. — 1963. — № 197. — С. 76-77.
65. Structural and kinetic characterization of an archaeal beta-class carbonic anhydrase / K. S. Smith, N. J. Cosper, C. Stalhandske [и др.] // *Journal of Bacteriology*. — 2000. — № 182(23). — С. 6605-13.
66. Crystal structure of the "cab"-type beta class carbonic anhydrase from the archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum* / P. Strop, K. S. Smith, T. M. Iverson [и др.] // *J Biol Chem*. — 2001. — № 276(13). — С. 10299-305.
67. Supuran, C. T. Overview on fungal and protozoan carbonic anhydrases / C. T. Supuran, C. Capasso // *Enzymes*. — 2025. — № 57. — С. 1-20.
68. Smith, K. S. Prokaryotic carbonic anhydrases / K. S. Smith, J. G. Ferry // *FEMS Microbiology Reviews*. — 2000. — № 4. — С. 335-66.
69. X-ray structure of beta-carbonic anhydrase from the red alga, *Porphyridium purpureum*, reveals a novel catalytic site for CO(2) hydration / S. Mitsuhashi, T. Mizushima, E. Yamashita [и др.] // *Journal of Biological Chemistry*. — 2000. — № 275(8). — С. 5521-6.
70. Crystal structure of *E. coli* beta-carbonic anhydrase, an enzyme with an unusual pH-dependent activity / J. D. Cronk, J. A. Endrizzi, M. R. Cronk [и др.] // *Protein Science*. — 2001. — № 10(5). — С. 911-922.
71. Carbonic anhydrase inhibitors. Characterization and inhibition studies of the most active beta-carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis*, Rv3588c / F. Carta, A. Maresca, A. S. Covarrubias [и др.] // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. — 2009. — № 23. — С. 6649–6654.
72. Structure and function of carbonic anhydrases from *Mycobacterium tuberculosis* / C. A. Suarez, A. M. Larsson, M. Högbom [и др.] // *The Journal of biological chemistry*. — 2005. — № 19. — С. 18782–18789.
73. Structural mechanics of the pH-dependent activity of beta-carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis* / A. S. Covarrubias, T. Bergfors, T. A. Jones, M. Högbom // *The Journal of biological chemistry*. — 2006. — № 281(8). — С. 4993–4999.
74. Rowlett, R. S. Structure and catalytic mechanism of the beta-carbonic anhydrases / R. S. Rowlett // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2010. — № 1804(2). — С. 362-73.

75. Rankin, M. R. Serendipitous high-resolution structure of *Escherichia coli* carbonic anhydrase 2 / M. R. Rankin, J. L. Smith // *Acta Crystallographica Section F — Structural Biology Communications*. — 2025. — № 81(Pt 2). — С. 47-52.
76. Protein purification and crystallization artifacts: The tale usually not told / E. Niedzialkowska, O. Gasiorowska, K. B. Handing [и др.] // *Protein Science*. — 2016. — № 25(3). — С. 720-33.
77. AlphaFold Protein Structure Database for Sequence-Independent Molecular Replacement / L. Chai, P. Zhu, J. Chai [и др.] // *Crystals*. — 2021. — № 11. — С. 1227.
78. Identification of a novel noncatalytic bicarbonate binding site in eubacterial beta-carbonic anhydrase / J. D. Cronk, R. S. Rowlett, K. Y. Zhang [и др.] // *Biochemistry*. — 2006. — № 14. — С. 4351-4361.
79. Crystal structure and kinetic studies of a tetrameric type II β -carbonic anhydrase from the pathogenic bacterium *Vibrio cholerae* / M. Ferraroni, P. S. Del, D. Vullo [и др.] // *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*. — 2015. — № 71(Pt 12). — С. 2449–2456.
80. Crystal structures of two tetrameric β -carbonic anhydrases from the filamentous ascomycete *Sordaria macrospora* / R. Lehneck, P. Neumann, D. Vullo [и др.] // *FEBS Journal*. — 2014. — № 281(7). — С. 1759-72.
81. Structural studies of β -carbonic anhydrase from the green alga *Coccomyxa*: inhibitor complexes with anions and acetazolamide / S. Huang, T. Hainzl, C. Grundström [и др.] // *PLoS One*. — 2011. — № 6(12). — С. e28458.
82. Scaffolding protein CcmM directs multiprotein phase separation in β -carboxysome biogenesis / K. Zang, H. Wang, F. U. Hartl, M. Hayer-Hartl // *Nature Structural & Molecular Biology*. — 2021. — № 28(11). — С. 909-922.
83. The structure, kinetics and interactions of the β -carboxysomal β -carbonic anhydrase, CcaA / LD McGurn, M. Moazami-Goudarzi, SA White [и др.] // *Biochemical Journal*. — 2016. — № 24. — С. 4559-4572.
84. Genomic and metagenomic survey of microbial carbonic anhydrase genes reveals novel clades, high diversity, and biome specificity / M E E Franco, E. Singer, S. Roux [и др.] // *International Society for Microbial Ecology Communications*. — 2026. — № 1. — С. ycag054.
85. Carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. A product of the cyn operon / M. B. Guilloton, J. J. Korte, A. F. Lamblin [и др.] // *The Journal of biological chemistry*. — 1992. — № 267(6). — С. 3731–3734.
86. A physiological role for cyanate-induced carbonic anhydrase in *Escherichia coli* / M. B. Guilloton, A. F. Lamblin, E. I. Kozliak [и др.] // *Journal of bacteriology*. — 1993. — № 5. — С. 1443–1451.

87. Why is carbonic anhydrase essential to *Escherichia coli*? / C. Merlin, M. Masters, S. McAteer, A. Coulson // *Journal of bacteriology*. — 2003. — № 185(21). — C. 6415–6424.
88. Hashimoto, M. Indispensability of the *Escherichia coli* carbonic anhydrases YadF and CynT in cell proliferation at a low CO₂ partial pressure / M. Hashimoto, J. Kato // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. — 2003. — № 4. — C. 919–922.
89. Lamblin, A. F. Functional analysis of the *Escherichia coli* K-12 *cyn* operon transcriptional regulation / A. F. Lamblin, J. A. Fuchs // *Journal of Bacteriology*. — 1994. — № 176(21). — C. 6613–22.
90. *Pseudomonas aeruginosa* β -carbonic anhydrase, psCA1, is required for calcium deposition and contributes to virulence / S. R. Lotlikar, B. B. Kayastha, D. Vullo [и др.] // *Cell Calcium*. — 2019. — C. 102080.
91. Three functional β -carbonic anhydrases in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: role in survival in ambient air / S. R. Lotlikar, S. Hnatusko, N. E. Dickenson [и др.] // *Microbiology (Reading, England)*. — 2013. — № 159(Pt 8). — C. 1748–1759.
92. Structure and inhibition studies of a type II beta-carbonic anhydrase psCA3 from *Pseudomonas aeruginosa* / M. A. Pinard, S. R. Lotlikar, C. D. Boone [и др.] // *Bioorganic & medicinal chemistry*. — 2015. — № 23(15). — C. 4831–4838.
93. Preliminary X-ray crystallographic analysis of β -carbonic anhydrase psCA3 from *Pseudomonas aeruginosa* / M. Pinard, S. Lotlikar, M. A. Patrauchan, R. McKenna // *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*. — 2013. — № 8. — C. 891–4.
94. Activation studies of the β -carbonic anhydrases from *Escherichia coli* with amino acids and amines / A. Nocentini, P. S. Del, M. D. Mastrolorenzo [и др.] // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. — 2020. — № 35(1). — C. 1379–1386.
95. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights / E. Padan, E. Bibi, M. Ito, T. A. Krulwich // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2005. — № 2. — C. 67–88.
96. Unraveling *Mycobacterium tuberculosis* acid resistance and pH homeostasis mechanisms / J. Laudouze, S. Canaan, A. Gouzy, P. Santucci // *Federation of European Biochemical Societies Letters*. — 2025. — № 12. — C. 1634–1648.
97. Padan, E. pH homeostasis in bacteria / E. Padan, D. Zilberstein, S. Schuldiner // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 1981. — № 650(2-3). — C. 151–166.
98. pH homeostasis in *Escherichia coli*: measurement by ³¹P nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate / J. L. Slonczewski, B. P. Rosen, J. R. Alger, R. M. Macnab // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1981. — № 78(10). — C. 6271–6275.

99. Booth, I. R. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria / I. R. Booth // Microbiological reviews. — 1985. — № 49(4). — C. 359–378.
100. Baker, J. J. Slow growth of *Mycobacterium tuberculosis* at acidic pH is regulated by phoPR and host-associated carbon sources / J. J. Baker, B. K. Johnson, R. B. Abramovitch // Molecular Microbiology. — 2014. — № 94(1). — C. 56-69.
101. Dual functioning by the PhoR sensor is a key determinant to *Mycobacterium tuberculosis* virulence / P. R. Singh, H. Goar, P. Paul [и др.] // PLoS Genet. — 2023. — № 19(12). — C. e1011070.
102. Wilks, J. C. pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry / J. C. Wilks, J. L. Slonczewski // Journal of Bacteriology. — 2007. — № 189(15). — C. 5601-7.
103. Poolman, B. Physicochemical homeostasis in bacteria / B. Poolman // FEMS Microbiology Reviews. — 2023. — № 47(4). — C. fuad033.
104. Macromolecular Crowding, Phase Separation, and Homeostasis in the Orchestration of Bacterial Cellular Functions / B. Monterroso, W. Margolin, A. J. Boersma [и др.] // Chemical Reviews . — 2024. — № 124(4). — C. 1899-1949.
105. Rho-dependent termination enables cellular pH homeostasis / K. Bhardwaj, A. Kalita, N. Verma [и др.] // Journal of Bacteriology. — 2024. — № 206(1). — C. e0035623.
106. The Effect of Substituted Benzene-Sulfonamides and Clinically Licensed Drugs on the Catalytic Activity of CynT2, a Carbonic Anhydrase Crucial for *Escherichia coli* Life Cycle / P. S. Del, L. V. De, S. Bua [и др.] // International Journal of Molecular Sciences. — 2020. — № 21(11). — C. 4175.
107. Activation studies of the β -carbonic anhydrases from *Escherichia coli* with amino acids and amines / A. Nocentini, P. S. Del, M. D. Mastrolorenzo [и др.] // Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry. — 2020. — № 35(1). — C. 1379-1386.
108. Carbonic Anhydrase Inhibitors as Novel Drugs against Mycobacterial β -Carbonic Anhydrases: An Update on In Vitro and In Vivo Studies / A. Aspatwar, J. Y. Winum, F. Carta [и др.] // Molecules (Basel, Switzerland). — 2018. — № 23(11). — C. 2911.
109. Design and synthesis of isoxazole-functionalized benzene sulphonamides as novel inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* β -carbonic anhydrases / R. Bandela, A. Singampalli, S. Maddipatla [и др.] // RSC medicinal chemistry. — 2025. — № 16(12). — C. 6368–6379.
110. Exploration of New Pyrazole-Hydrazone-Benzenesulfonamide Conjugates as Potent Mycobacterial Carbonic Anhydrase Inhibitors: Design, Synthesis, and Biological Evaluation / P. Kumar, A. Singampalli, R. Bandela [и др.] // ChemMedChem. — 2025. — № 20(23). — C. e202500633.

111. Mycobacterial β -carbonic anhydrases: Molecular biology, role in the pathogenesis of tuberculosis and inhibition studies / J. Parkkinen, R. Bhowmik, M. Tolvanen [и др.] // *The Enzymes*. — 2024. — № 55. — С. 343–381.
112. Design, synthesis and antimicrobial activity of novel quinoline derivatives: an in silico and in vitro study / V. K. Singh, P. Kumari, A. Som [и др.] // *Journal of biomolecular structure & dynamics*. — 2024. — № 42(13). — С. 6904–6924.
113. Benzoxaboroles in medicinal chemistry: A structure-guided perspective on next-generation therapeutics / A. Nagar, D. Sarkar, R. Bardiya [и др.] // *European journal of medicinal chemistry*. — 2026. — № 301. — С. 118224.
114. Exploring aliphatic sulfonamides as multiclass inhibitors of the carbonic anhydrases from the pathogen bacterium *Vibrio cholerae* / N. Paoletti, S. Giovannuzzi, A. Bonardi [и др.] // *Archiv der Pharmazie*. — 2025. — № 1. — С. e2400814.
115. Tetrazole Derivatives as Multiclass Inhibitors of Bacterial Carbonic Anhydrases / Ammara, A., Giovannuzzi [и др.] // *Archiv der Pharmazie*. — 2025. — № 358(12). — С. e70177.
116. Bacterial Carbonic Anhydrase Inhibitor CAI0019 Demonstrates Efficacy in *Enterococcus faecium* Septicemic Peritonitis Mouse Model While Sparing the Microbiome / N. S. Abutaleb, K. J. Holly, C. K. Metcalfe [и др.] // *ACS Infectious Diseases*. — 2026. — № 12(1). — С. 176–189.
117. Structure-activity relationship studies for inhibitors for vancomycin-resistant *Enterococcus* and human carbonic anhydrases / W. An, K. J. Holly, A. Nocentini [и др.] // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. — 2022. — № 37(1). — С. 1838–1844.
118. Angeli, A. Bacterial γ -carbonic anhydrases / A. Angeli // *Enzymes*. — 2024. — № 55. — С. 93–120.
119. Alber, B. E. A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila* / B. E. Alber, J. G. Ferry // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1994. — № 91(15). — С. 6909–6913.
120. A closer look at the active site of gamma-class carbonic anhydrases: high-resolution crystallographic studies of the carbonic anhydrase from *Methanosarcina thermophila* / T. M. Iverson, B. E. Alber, C. Kisker [и др.] // *Biochemistry*. — 2000. — № 39(31). — С. 9222–31.
121. Raetz, C. R. A left-handed parallel beta helix in the structure of UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase / C. R. Raetz, S. L. Roderick // *Science*. — 1995. — № 270(5238). — С. 997–1000.

122. Structure determination of LpxA from the lipopolysaccharide-synthesis pathway of *Acinetobacter baumannii* / J. Badger, B. Chie-Leon, C. Logan [и др.] // *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*. — 2012. — № 68(Pt 12). — С. 1477-81.
123. Structures of the γ -class carbonic anhydrase homologue YrdA suggest a possible allosteric switch / H. M. Park, J. H. Park, J. W. Choi [и др.] // *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*. — 2012. — № 68(Pt 8). — С. 920–926.
124. Herrou, J. Molecular structure of the *Brucella abortus* metalloprotein RicA, a Rab2-binding virulence effector / J. Herrou, S. Crosson // *Biochemistry*. — 2013. — № 52(50). — С. 9020-8.
125. Biochemical, structural, and computational studies of a γ -carbonic anhydrase from the pathogenic bacterium *Burkholderia pseudomallei* / F. A. Di, L. V. De, E. Langella [и др.] // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. — 2022. — № 20. — С. 4185-4194.
126. Biochemical characterization of the γ -carbonic anhydrase from the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*, PgiCA / P. S. Del, L. V. De, D. Vullo [и др.] // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. — 2014. — № 4. — С. 532–537.
127. *Escherichia coli*-carbonic anhydrase: characterisation and effects of simple aromatic/heterocyclic sulphonamide inhibitors / P. S. Del, S. Bua, C. T. Supuran, C. Capasso // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. — 2020. — № 35(1). — С. 1545–1554.
128. Comparison of the sulfonamide inhibition profiles of the α -, β - and γ -carbonic anhydrases from the pathogenic bacterium *Vibrio cholerae* / P. S. Del, D. Vullo, L. V. De [и др.] // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. — 2016. — № 8. — С. 1941-1946.
129. Inhibition of α -, β - and γ -carbonic anhydrases from the pathogenic bacterium *Vibrio cholerae* with aromatic sulphonamides and clinically licenced drugs - a joint docking/molecular dynamics study / A. Bonardi, A. Nocentini, S. M. Osman [и др.] // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. — 2021. — № 36(1). — С. 469–479.
130. 4-Sulfamoylphenylalkylamides as Inhibitors of Carbonic Anhydrases Expressed in *Vibrio cholerae* / F. Mancuso, L. L. De, F. Bucolo [и др.] // *ChemMedChem*. — 2021. — № 16(24). — С. 3787–3794.
131. Target validation: linking target and chemical properties to desired product profile / P. G. Wyatt, I. H. Gilbert, K. D. Read, A. H. Fairlamb // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. — 2011. — № 11(10). — С. 1275-83.
132. Roy, A. Early Probe and Drug Discovery in Academia: A Minireview / A. Roy // *High-throughput*. — 2018. — № 7(1). — С. 4.
133. Target assessment for antiparasitic drug discovery / J. A. Frearson, P. G. Wyatt, I. H. Gilbert, A. H. Fairlamb // *Trends in Parasitology*. — 2007. — № 23(12). — С. 589-95.

134. Innovative Approach for a Classic Target: Fragment Screening on Trypanothione Reductase Reveals New Opportunities for Drug Design / A. Fiorillo, G. Colotti, C. Exertier [и др.] // *Frontiers in molecular biosciences*. — 2022. — № 9. — С. 900882.
135. Tanoli, Z. Validation guidelines for drug-target prediction methods / Z. Tanoli, A. Schulman, T. Aittokallio // *Expert Opinion on Drug Discovery*. — 2025. — № 20(1). — С. 31–45.
136. Nath, A. Prediction of Human Drug Targets and Their Interactions Using Machine Learning Methods: Current and Future Perspectives / A. Nath, P. Kumari, R. Chaube // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. — 2018. — № 1762. — С. 21–30.
137. Cichonska, A. Identification of drug candidates and repurposing opportunities through compound-target interaction networks / A. Cichonska, J. Rousu, T. Aittokallio // *Expert opinion on drug discovery*. — 2015. — № 10(12). — С. 1333–1345.
138. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Human Carbonic Anhydrases: An Update on the Design of Isoform-Specific Modulators of Activity / K. D'Ambrosio, F. A. Di, V. Alterio [и др.] // *Chemical reviews*. — 2025. — № 1. — С. 150–222.
139. Ramos, P. Z. Target engagement in bacterial and protozoan pathogens: in vitro and cellular assays for drug discovery / P. Z. Ramos, C M C Catta-Preta, R. M. Couñago // *Current Opinion in Structural Biology*. — 2026. — № 96. — С. 103194.
140. Forum, on Neuroscience and Nervous System Disorders Improving and Accelerating Therapeutic Development for Nervous System Disorders: Workshop Summary / on Neuroscience and Nervous System Disorders Forum, on Health Sciences Policy Board, o. M. Institute. — 1. — Washington (DC) : National Academies Press (US), 2014. — 118 с .
141. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» (ред. от 22.01.2025).
142. Study on the effect of deer bone in improving rheumatoid arthritis based on the "drug-target-pathway" association network / Y. Li, A. Li, Y. Teng [и др.] // *Journal of Ethnopharmacology*. — 2025. — № 346. — С. 119684.
143. Novel systems biology experimental pipeline reveals matairesinol's antimetastatic potential in prostate cancer: an integrated approach of network pharmacology, bioinformatics, and experimental validation / R. Rajadnya, N. Sharma, A. Mahajan [и др.] // *Briefings in Bioinformatics*. — 2024. — № 25(5). — С. bbae466.
144. Applications of aptamers in pharmaceutical analysis: Comprehensively empowering drug development / X. Cheng, J. Long, W. Chen [и др.] // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. — 2026. — № 268. — С. 117179.

145. Cardona, S. T. Innovative perspectives on the discovery of small molecule antibiotics / S. T. Cardona, A S M Z Rahman, N. J. Novomisky // *NPJ Antimicrobials and Resistance*. — 2025. — № 3(1). — С. 19.
146. Computational Strategies in Drug Discovery: Leveraging Subtractive Genomic Analysis for Target Identification / V. Patil, S. Desai, V. Patel, V. Somase // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. — 2025. — № 26(9). — С. 1271-1286.
147. Лысикова, И. В. Регуляторные подходы к программе разработки лекарственных препаратов, применяемых для лечения инфекционных заболеваний / И. В. Лысикова, О. И. Басова // *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. — 2019. — № 4. — С. 231-240.
148. Microbiological Analysis from a Phase 2 Randomized Study in Adults Evaluating Single Oral Doses of Gepotidacin in the Treatment of Uncomplicated Urogenital Gonorrhea Caused by *Neisseria gonorrhoeae* / N. E. Scangarella-Oman, M. Hossain, P. B. Dixon [и др.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2018. — № 62(12). — С. e01221-18.
149. Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective / J. G. Moffat, F. Vincent, J. A. Lee [и др.] // *Nature Reviews Drug Discovery*. — 2017. — № 16(8). — С. 531-543.
150. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature*. — 1970. — № 227(5259). — С. 680-685.
151. Kraft, P et al PILATUS detector performance / P et al Kraft // *Journal of Synchrotron Radiation*. — 2009. — № 16. — С. 368–375.
152. The macromolecular crystallography beamlines at BESSY II of the Helmholtz-Zentrum Berlin: Current status and perspectives / Mueller Uwe, Forster Ronald, Hellmig Michael [и др.] // *The European Physical Journal Plus*. — 2015. — № 130. — С. 141.
153. Rigaku Oxford Diffraction, CrysAlisPro Software System, version 41.104a. Rigaku Oxford Diffraction, Yarnton, England, 2021.
154. Vagin, A. A. Molrep: An automated program for molecular replacement / A. A. Vagin, A. Teplyakov // *Journal of Applied Crystallography*. — 1997. — № 30. — С. 1022-1025.
155. Phaser crystallographic software / A. J. McCoy, W. G. Ralf, D. A. Paul [и др.] // *Journal of Applied Crystallography*. — 2007. — № 40. — С. 658-674.
156. Structure of bovine carbonic anhydrase II at 1.95 Å resolution / R. Saito, T. Sato, A. Ikai, N. Tanaka // *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*. — 2004. — № 60(Pt 4). — С. 792-5.
157. High-resolution structure of human carbonic anhydrase II complexed with acetazolamide reveals insights into inhibitor drug design / K. H. Sippel, A. H. Robbins, J.

- Domsic [и др.] // *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*. — 2009. — № 10. — С. 992-995.
158. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures / N. M. Garib, Skubak Pavol, A. A. Lebedev [и др.] // *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*. — 2011. — № 67. — С. 355–367.
 159. Features and Development of Coot / P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan // *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*. — 2010. — № 66. — С. 486–501.
 160. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine / P. V. Afonine, R. W. Grosse-Kunstleve, N. Echols [и др.] // *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*. — 2012. — № 68(Pt 4). — С. 352–367.
 161. Berman, H. Announcing the worldwide Protein Data Bank / H. Berman, K. Henrick, H. Nakamura // *Nature Structural & Molecular Biology*. — 2003. — № 10. — С. 980.
 162. National Center for Biotechnology Information (NCBI) : электронный ресурс. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 03.03.2026)
 163. The, U. C. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021 / U. C. The // *Nucleic Acids Research*. — 2021. — № D1. — С. D480–D489.
 164. BLAST+: architecture and applications / C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan [и др.] // *BMC Bioinformatics*. — 2009. — № 10. — С. 421.
 165. Notredame, C. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment / C. Notredame, D. G. Higgins, J. Heringa // *Journal of Molecular Biology*. — 2000. — № 302(1). — С. 205-17.
 166. Sievers, F. Clustal omega / F. Sievers, D. G. Higgins // *Curr Protoc Bioinformatics*. — 2014. — № 48. — С. 3.13.1-3.13.16.
 167. DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System / W. L. DeLano. — Текст : электронный // pymol.org : [сайт]. — URL: <http://www.pymol.org> (дата обращения: 25.09.2022).
 168. Robert, X. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server / X. Robert, P. Gouet // *Nucleic Acids Research*. — 2014. — № 42(Web Server issue). — С. W320-4.
 169. Eriksson, A. E. Refined structure of human carbonic anhydrase II at 2.0 Å resolution / A. E. Eriksson, T. A. Jones, A. Liljas // *Proteins*. — 1988. — № 4(4). — С. 274-82.
 170. Henikoff, S. Amino acid substitution matrices from protein blocks / S. Henikoff, J. G. Henikoff // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1992. — № 89(22). — С. 10915-10919.

171. The EcoCyc Database in 2021 / I. M. Keseler, S. Gama-Castro, A. Mackie [и др.] // *Frontiers in Microbiology*. — 2021. — № 12. — С. 711077.
172. The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways / P. D. Karp, R. Billington, R. Caspi [и др.] // *Briefings in Bioinformatics*. — 2019. — № 20(4). — С. 1085-1093.
173. ShiBASE: an integrated database for comparative genomics of *Shigella* / J. Yang, L. Chen, J. Yu [и др.] // *Nucleic Acids Research*. — 2006. — № 1. — С. D398-401.
174. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel [и др.] // *Nature*. — 2021. — № 596(7873). — С. 583-589.
175. Evans, R. Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer / R. Evans. — Текст : электронный // *bioRxiv* : [сайт]. — URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.04.463034v2> (дата обращения: 03.03.2025).
176. Lomize, A. L. Spatial arrangement of proteins in planar and curved membranes by PPM 3.0 / A. L. Lomize, S. C. Todd, I. D. Pogozheva // *Protein Science*. — 2022. — № 31(1). — С. 209-220.
177. Structural adaptations of proteins to different biological membranes / I. D. Pogozheva, S. Tristram-Nagle, H. I. Mosberg, A. L. Lomize // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2013. — № 1828(11). — С. 2592-608.
178. Lomize, A. L. Anisotropic solvent model of the lipid bilayer. 2. Energetics of insertion of small molecules, peptides, and proteins in membranes / A. L. Lomize, I. D. Pogozheva, H. I. Mosberg // *Journal of Chemical Information and Modeling*. — 2011. — № 51(4). — С. 930-946.
179. OPLS4: Improving Force Field Accuracy on Challenging Regimes of Chemical Space / C. Lu, C. Wu, D. Ghoreishi [и др.] // *Journal of Chemical Theory and Computation*. — 2021. — № 17(7). — С. 4291-4300.
180. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water / W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura [и др.] // *Journal of Chemical Physics*. — 1983. — № 79. — С. 926.
181. Martyna, G. J. Nosé–Hoover chains: The canonical ensemble via continuous dynamics / G. J. Martyna, M. L. Klein, M. Tuckerman // *The Journal of chemical physics*. — 1992. — № 4. — С. 2635-2643.
182. Bowers, K. J. Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters / K. J. Bowers // *SC '06: Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing*. — Tampa, FL, USA : Institute of Electrical and Electronics Engineers, 2006. — С. 43-43.

183. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field / J. Lee, X. Cheng, J. M. Swails [и др.] // *J Chem Theory Comput.* — 2016. — № 12(1). — С. 405-13.
184. Heterogeneous parallelization and acceleration of molecular dynamics simulations in GROMACS / S. P_all, A. Zhmurov, P. Bauer [и др.] // *The Journal of Chemical Physics.* — 2020. — № 153(13). — С. 134110.
185. CHARMM36m: An improved force field for folded and intrinsically disordered proteins / Huang, J., Rauscher [и др.] // *Nature Methods.* — 2017. — № 1. — С. 71–73.
186. Dibyajyoti, Maity md-davis / Maity Dibyajyoti. — Текст : электронный // [github.com](https://github.com/djmaity/md-davis) : [сайт]. — URL: <https://github.com/djmaity/md-davis> (дата обращения: 25.09.2023).
187. Demir, Ö. RMSD-based clustering tutorial / Ö. Demir. — Текст : электронный // [ctlee.github.io](https://ctlee.github.io/BioChemCoRe-2018/clustering/) : [сайт]. — URL: <https://ctlee.github.io/BioChemCoRe-2018/clustering/> (дата обращения: 30.09.2023).
188. Inhibition of the β -carbonic anhydrase from *Streptococcus pneumoniae* by inorganic anions and small molecules: toward innovative drug design of antiinfectives? / P. Burghout, D. Vullo, A. Scozzafava [и др.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* — 2011. — № 19(1). — С. 243–248.
189. Stoliarskaia, M. Y. Bacterial β -carbonic anhydrases: a six-step prioritization framework for antibacterial target validation / M. Y. Stoliarskaia // *Archives of Microbiology.* — 2026. — № 208. — С. 247.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица П1. Остатки внутридимерного и димер-димерного интерфейсов mtCA2. К интерфейсу отнесены остатки, имеющие хотя бы один тяжёлый атом в пределах 0,45 нм от соседней субъединицы в первом кадре производственного запуска. Нумерация соответствует UniProt P9WPJ9.

Интерфейс	Остатки
Внутридимерный	1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 19, 26, 29, 30, 32, 36, 37, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 82, 83, 86, 87, 92, 102, 103, 113, 114, 115, 116, 119, 163, 177, 179, 183, 184, 185, 186, 187, 188
Димер-димерный	71, 72, 73, 78, 112, 114, 117, 118, 119, 121, 122, 125, 128, 129, 156, 160, 161, 162, 169, 206

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица П2. Результаты BLASTp поиска для последовательности EcoCAγ (WP_009008373.1).

Accession	Организм	Штамм	Bit Score	E-value	Идентичность (%)	Ген	Длина (а.о.)
A0A9P2ID48	<i>Escherichia coli</i> O8	EcoliO8-0002A	519	0.0	100%	DP913_22660	256 AA
A0AA35F7L4	<i>Escherichia coli</i> O26	RM8426	519	0.0	100%	I3M_24345	256 AA
A0A9Q5U8X2	<i>Shigella boydii</i>	227	519	0.0	100%	CEH00_11850	256 AA
C3SRD7	<i>Escherichia coli</i>	Multiple strains	519	0.0	100%	yrdA	256 AA
A0A0H3JPK3	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	EDL933	519	0.0	99.6%	Z4650	256 AA
A0A1X3IUF1	<i>Escherichia coli</i>	TA447	516	0.0	99.6%	ECXG_02109	256 AA
A0A0H2Z486	<i>Escherichia coli</i> O1:K1 / APEC	APEC O1	516	0.0	99.2%	APECO1_3166	256 AA
A0A2G8ZMY4	<i>Escherichia coli</i>	Neonatal meningitis strains	516	0.0	99.2%	D3C88_29505	256 AA
Q1R653	<i>Escherichia coli</i>	UTI89	516	0.0	99.2%	yrdA, UTI89_C3724	256 AA
Q3YWX9	<i>Shigella sonnei</i>	Ss046	515	0.0	99.2%	yrdA, SSON_3420	256 AA
A0A271U1H0	<i>Escherichia coli</i>	B8S56; T0181B.E-10	515	0.0	99.2%	D4N09_20060	256 AA
A0A200NJ30	<i>Shigella flexneri</i>	ESBL-06065-006	514	0.0	99.2%	CEG97_10655	256 AA
A0A1X3JBL2	<i>Escherichia coli</i>	H386	514	0.0	99.2%	ECVG_05240	256 AA
A0A236LML5	<i>Shigella sonnei</i>	ECH+15	514	0.0	99.2%	CI727_21070	256 AA
A0A398R136	<i>Shigella boydii</i>	287711	514	0.0	99.2%	DLV22_22625	256 AA

A0A979H4V2	<i>Escherichia coli</i>	SE11	514	0.0	99.2%	ECSE_3554	256 AA
J7R9P7	<i>Escherichia coli</i>	Multiple strains	514	0.0	99.2%	CCS08_00020	256 AA
A0A2A6Q112	<i>Escherichia coli</i>	462023	513	0.0	98.8%	DNX30_25590	256 AA
D3GYR3	<i>Escherichia coli O44:H18</i>	042	513	0.0	98.8%	EC042_3556	256 AA
Q32B70	<i>Shigella dysenteriae</i>	Sd197	513	0.0	98.8%	yrdA, SDY_3456	256 AA
A0A2S8DCY0	<i>Shigella dysenteriae</i>	BS979	513	0.0	98.8%	C5K18_09980	256 AA
B2U2P7	<i>Shigella boydii</i>	CDC 3083-94	511	0.0	98.8%	SbBS512_E3665	256 AA
A0A4V1DQZ1	<i>Escherichia coli O145:NM</i>	FWSEC0002	511	0.0	98.4%	CCU01_002670	256 AA
A0AA36L182	<i>Escherichia coli O25b:H4-ST131</i>	EC958	508	0.0	97.3%	EC958_3673	256 AA
A0A5F1HUT1	<i>Escherichia sp. E1130</i>	not specified	498	1.00E-177	95.7%	CQJ27_19625	256 AA
AAG58401.1	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	EDL933	530	0.0	100.00%	not specified	256 AA
EFN9619321.1	<i>Escherichia coli</i>	SMS-3-5	529	0.0	99.61%	yrdA	256 AA
HAI7150347.1	<i>Escherichia coli</i>	100-10	529	0.0	99.61%	yrdA	256 AA
EFO0058622.1	<i>Escherichia coli</i>	K-11600	528	0.0	99.61%	yrdA	256 AA
EFO1236215.1	<i>Escherichia coli</i>	K-11600	528	0.0	99.61%	yrdA	256 AA
EGE1835038.1	<i>Escherichia coli</i>	428091	528	0.0	99.61%	not specified	256 AA
PAU14071.1	<i>Escherichia coli</i>	STEC 440	528	0.0	99.61%	not specified	256 AA
AST64299.1	<i>Escherichia coli</i>	CDC#03-98	528	0.0	99.61%	not specified	256 AA
EEW3258684.1	<i>Escherichia coli</i>	FSIS11814689	528	0.0	99.61%	not specified	256 AA
WP_001300496.1	<i>Shigella flexneri</i>	not specified	525	0.0	99.22%	yrdA	256 AA
ABE09161.1	<i>Escherichia coli UTI89</i>	not specified	526	0.0	99.22%	yrdA	256 AA
AAZ89983.1	<i>Shigella sonnei</i>	Ss046	526	0.0	99.22%	yrdA	256 AA
ABB63435.1	<i>Shigella dysenteriae</i>	Sd197	523	0.0	98.83%	yrdA	256 AA
ACD06884.1	<i>Shigella boydii</i>	CDC 3083-94	522	0.0	98.83%	yrdA	256 AA
AKK41540.2	<i>Escherichia coli APEC O2-211</i>	APEC O2-211	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
APT60686.2	<i>Escherichia coli</i>	2016C-3936C1	524	0.0	98.83%	not specified	256 AA
AQV25248.1	<i>Escherichia coli</i>	Ecol_276	518	0.0	97.27%	not specified	256 AA
ASI14781.1	<i>Escherichia coli</i>	M160133	522	0.0	98.44%	not specified	256 AA
ASZ43253.1	<i>Escherichia coli</i>	646	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
ATB76515.1	<i>Escherichia coli</i>	317	520	0.0	98.05%	not specified	256 AA

AVM04876.1	<i>Escherichia coli</i>	AS19-RrmA-	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
AVS07447.1	<i>Escherichia coli</i>	CFSAN06 4036	524	0.0	98.83%	not specified	256 AA
AVV72671.1	<i>Escherichia coli</i>	RM14723	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
AWS63028.1	<i>Escherichia coli</i>	AR_0085	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EAA0964815.1	<i>Escherichia coli</i>	312802	527	0.0	99.61%	not specified	256 AA
EAA1970007.1	<i>Escherichia coli</i>	314968	527	0.0	99.61%	not specified	256 AA
EAA5159200.1	<i>Shigella boydii</i>	not specified	520	0.0	98.44%	not specified	256 AA
EAA6703637.1	<i>Shigella flexneri</i>	not specified	522	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EAB0495533.1	<i>Shigella flexneri</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EAB6804885.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EAB6913067.1	<i>Shigella sonnei</i>	not specified	522	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EAB7361987.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EAB8220378.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	525	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EEW3329770.1	<i>Escherichia albertii</i>	not specified	504	0.0	94.14%	not specified	256 AA
EEW3554759.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	524	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EEW3743539.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	522	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EEW3789048.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EEW4294531.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	522	0.0	98.44%	not specified	256 AA
EEW4358676.1	<i>Escherichia albertii</i>	not specified	503	0.0	94.14%	not specified	256 AA
EEW4652710.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EEW6056902.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA

EEW6212069. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	524	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EEW6398507. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	527	0.0	99.61%	not specified	256 AA
EEW6402512. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	521	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EEW7218593. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	517	0.0	97.27%	not specified	256 AA
EEW7497948. 1	<i>Escherichia albertii</i>	not specified	519	0.0	98.05%	not specified	256 AA
EEW8309441. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	519	0.0	97.66%	not specified	256 AA
EEW8732882. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	524	0.0	99.22%	not specified	256 AA
EEW8765006. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	520	0.0	98.44%	not specified	256 AA
EFG3869523. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	521	0.0	98.44%	not specified	256 AA
EFN8557156. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	516	0.0	96.88%	not specified	256 AA
EFN8618639. 1	<i>Escherichia coli H8</i>	not specified	521	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EFN8681924. 1	<i>Escherichia coli</i>	ECOL-18-VL-NY-MS-0010	522	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EFN8764742. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	521	0.0	98.44%	not specified	256 AA
EFN8797250. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EFN8816387. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	527	0.0	99.61%	not specified	256 AA
EFN8849632. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	520	0.0	98.05%	not specified	256 AA
EFN8873714. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	518	0.0	97.27%	not specified	256 AA
EFN9124232. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	522	0.0	98.44%	not specified	256 AA

EFN9205066. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EFN9506644. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	520	0.0	98.05%	not specified	256 AA
EFN9574787. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EFN9665163. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	525	0.0	99.22%	not specified	256 AA
EFN9679475. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EFN9945208. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	521	0.0	98.44%	not specified	256 AA
EFO0191537. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	526	0.0	99.61%	not specified	256 AA
EFO0220728. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EFO0441867. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	519	0.0	98.44%	not specified	256 AA
EFO0847908. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	525	0.0	99.22%	not specified	256 AA
EFO0968559. 1	<i>Escherichia albertii</i>	not specified	505	0.0	94.14%	not specified	256 AA
EFO1238048. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	527	0.0	99.61%	not specified	256 AA
EFO1264484. 1	<i>Escherichia albertii</i>	not specified	500	0.0	93.36%	not specified	256 AA
EFO1289075. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	522	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EFO1323906. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	525	0.0	99.22%	not specified	256 AA
EFO2105788. 1	<i>Escherichia coli O100</i>	not specified	527	0.0	100.00%	not specified	256 AA
EFO2147474. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EFO2305236. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	527	0.0	99.61%	not specified	256 AA
EFO2448479. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	526	0.0	99.61%	not specified	256 AA

EFO2538915. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	522	0.0	98.44%	not specified	256 AA
EFO2616675. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	99.22%	not specified	256 AA
EFO2918728. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	521	0.0	98.44%	not specified	256 AA
EFO3024445. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	521	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EFO3032417. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	522	0.0	98.44%	not specified	256 AA
EFO3285139. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	524	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EFO3304054. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	520	0.0	98.44%	not specified	256 AA
EFO3528942. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	524	0.0	99.22%	not specified	256 AA
EFO3907766. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	521	0.0	98.44%	not specified	256 AA
EFO3924556. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	518	0.0	97.27%	not specified	256 AA
EFO4690117. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	524	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EFO4718156. 1	<i>Escherichia albertii</i>	not specified	504	0.0	93.75%	not specified	256 AA
EFX8848645. 1	<i>Shigella dysenteriae</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EFY9874494. 1	<i>Shigella dysenteriae</i>	not specified	521	0.0	98.44%	not specified	256 AA
EGD4487718. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	520	0.0	98.05%	not specified	256 AA
EGD4723122. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	519	0.0	98.05%	not specified	256 AA
EGD4984246. 1	<i>Shigella sonnei</i>	not specified	522	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EGD6049315. 1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EGD7739775. 1	<i>Shigella flexneri</i>	not specified	522	0.0	98.83%	not specified	256 AA

EGD8064708.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EGD9483844.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	524	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EGE0302056.1	<i>Escherichia albertii</i>	not specified	518	0.0	97.27%	not specified	256 AA
EGE1177382.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	525	0.0	99.22%	not specified	256 AA
EGE1767105.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	522	0.0	98.44%	not specified	256 AA
EGE2963483.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EGE3162819.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EGE4051107.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	524	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EGI39096.1	<i>Escherichia coli</i> TA280	not specified	524	0.0	98.83%	not specified	256 AA
EGO8888732.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	526	0.0	99.22%	not specified	256 AA
HAJ7139909.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	521	0.0	98.83%	not specified	256 AA
KAA2070767.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	519	0.0	97.66%	not specified	256 AA
KAB2549532.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	517	0.0	97.27%	not specified	256 AA
MJL96051.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	525	0.0	98.83%	not specified	256 AA
NAT99852.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	515	0.0	97.27%	not specified	256 AA
OKX06337.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
OTC09615.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	527	0.0	99.61%	not specified	256 AA
OTC45821.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	522	0.0	98.44%	not specified	256 AA
OWG60788.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	520	0.0	98.44%	not specified	256 AA

OWP95326.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	522	0.0	98.83%	not specified	256 AA
OYI16828.1	<i>Shigella sonnei</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
PAB76329.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
PAS84799.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	522	0.0	98.83%	not specified	256 AA
PBO93658.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	525	0.0	98.83%	not specified	256 AA
PBQ51002.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	522	0.0	98.83%	not specified	256 AA
PBU37784.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
PDN91272.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	527	0.0	99.61%	not specified	256 AA
PJG02728.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
PJI57065.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	519	0.0	98.05%	not specified	256 AA
POL55613.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	525	0.0	98.83%	not specified	256 AA
PUQ95086.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
RCC25353.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
RCP53113.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	521	0.0	98.83%	not specified	256 AA
RCP62252.1	<i>Escherichia coli</i>	MOD1-ECOR22	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
RCP89485.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	521	0.0	98.44%	not specified	256 AA
RCQ59162.1	<i>Escherichia coli</i>	AVC79	522	0.0	98.83%	not specified	256 AA
RCT00869.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	518	0.0	97.66%	not specified	256 AA
RCZ30651.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	521	0.0	98.44%	not specified	256 AA

RGV08342.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
RIG15480.1	<i>Shigella flexneri</i>	DMB SH20026	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
RJX90442.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
RLW74665.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	522	0.0	98.44%	not specified	256 AA
RVE00389.1	<i>Escherichia coli</i>	CCPM 6201	523	0.0	98.83%	not specified	256 AA
RVE23968.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	522	0.0	98.44%	not specified	256 AA
TEZ00913.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	527	0.0	99.61%	not specified	256 AA
TGB57076.1	<i>Escherichia sp. E5028</i>	E5028	509	0.0	95.70%	not specified	256 AA
TGB72956.1	<i>Escherichia sp. E4930</i>	E4930	not specified	not specified	not specified	not specified	256 AA
TGB78408.1	<i>Escherichia sp. E4702</i>	not specified	504	0.0	94.92%	not specified	256 AA
TGB79651.1	<i>Escherichia sp. E4694</i>	not specified	508	0.0	95.31%	not specified	256 AA
TGB96108.1	<i>Escherichia sp. E3356</i>	E3356	not specified	not specified	not specified	not specified	256 AA
TGC15105.1	<i>Escherichia sp. E2562</i>	E2562	not specified	not specified	not specified	not specified	256 AA
TGC22445.1	<i>Escherichia sp. E1130</i>	E1130	not specified	not specified	not specified	not specified	256 AA
UMS14932.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	527	0.0	99.61%	not specified	256 AA
UMT07508.1	<i>Escherichia coli</i>	A9	522	0.0	98.44%	not specified	256 AA
UMT21253.1	<i>Escherichia coli</i>	not specified	520	0.0	98.05%	not specified	256 AA

KAA2039314. 1	<i>Escherichia coli</i>	EC235_ST 117C	519	0.0	97.66%	not specified	256 AA
------------------	-------------------------	------------------	-----	-----	--------	---------------	--------

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Рисунок П 1. Предсказанная ориентация тримера EсoCAγ в липидном бислое по данным сервера PPM 3.0s

Orientation of Proteins in Membranes

Depth/Hydrophobic Thickness	$\Delta G_{\text{transfer}}$	Tilt Angle
42.4 ± 1.9 Å	-64.8 kcal/mol	3. ± 2. °

Membrane Embedded Residues (in Hydrocarbon Core)

Subunits	Tilt	Segments
		Embedded_residues:
A	17	12-41
B	17	12-41,45
C	14	12-41,45
		Transmembrane_secondary_structure_segments:
A	23	1(13- 41)
B	22	1(13- 41)
C	21	1(13- 41)

Output Messages

heteroatoms included

Download Output File

[PDB file](#)

Image of the protein in membrane

[jmol](#) | [iCn3D](#)

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Рисунок П2. Репрезентативные модели ЕсоСАγ внутри кластеров для мембранной системы. Обозначение CI соответствует номеру кластера, N - число моделей, входящих в кластер. Модели представлены для второго запуска длительной траектории.

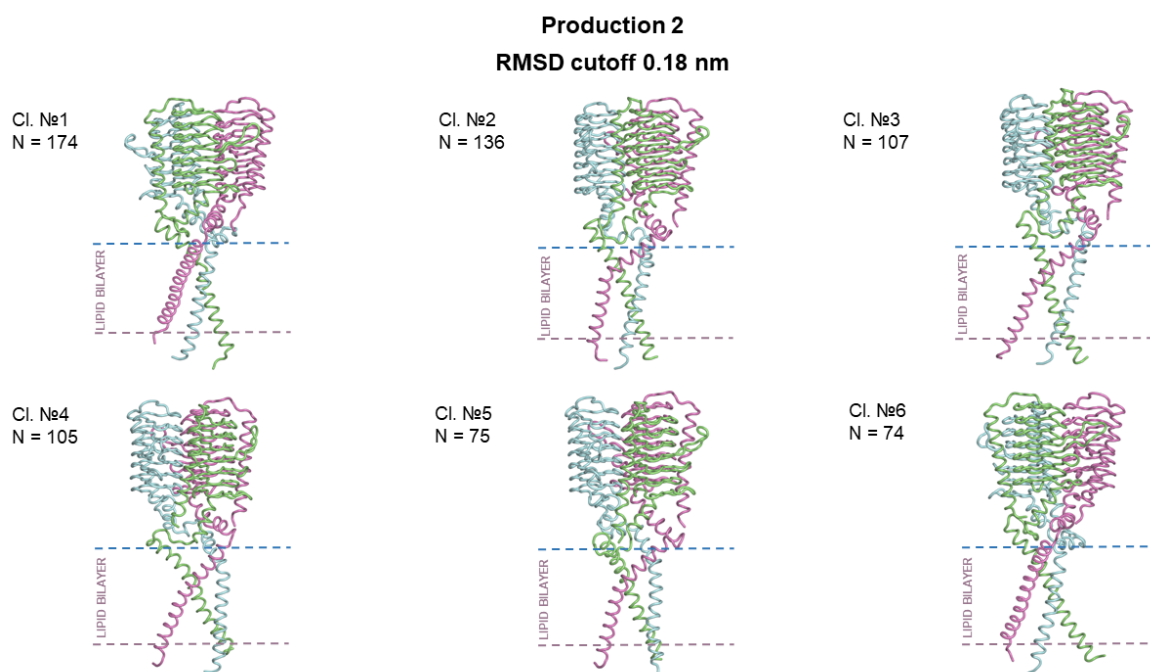


Рисунок П3. Репрезентативные модели ЕсоСАγ внутри кластеров для мембранной системы. Обозначение CI соответствует номеру кластера, N - число моделей, входящих в кластер. Модели представлены для третьего запуска длительной траектории.

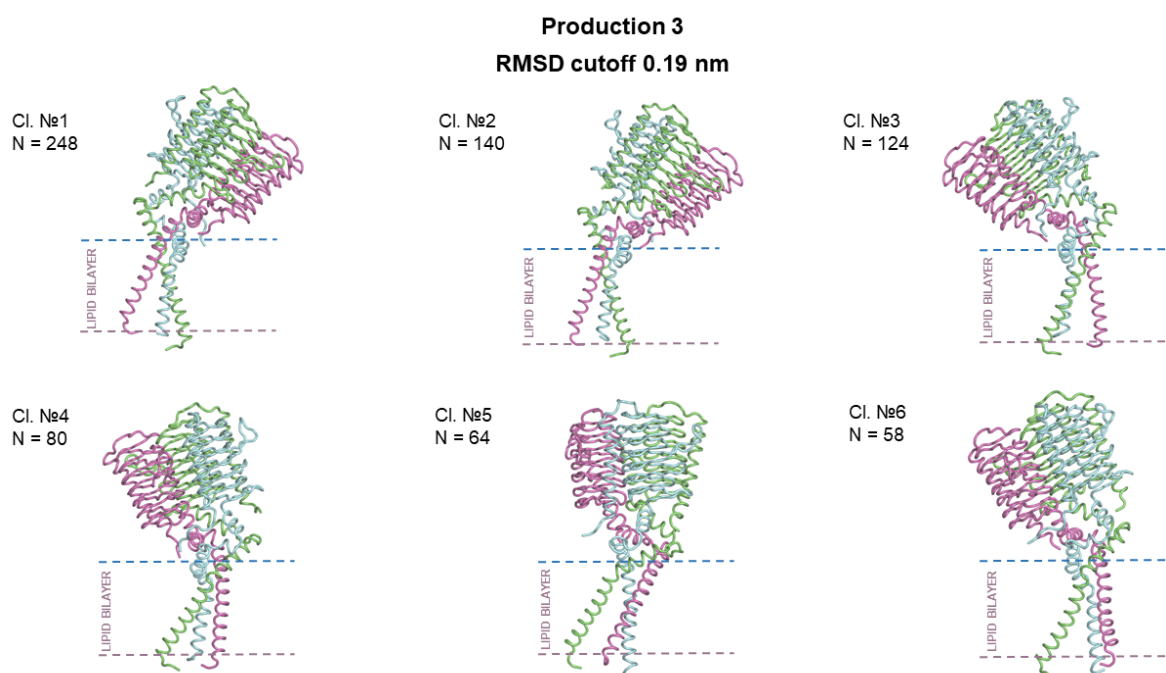


Рисунок П4. Репрезентативные модели ЕсоСАγ внутри кластеров для водной системы. Обозначение Cl соответствует номеру кластера, N - число моделей, входящих в кластер. Модели представлены для второго запуска длительной траектории.

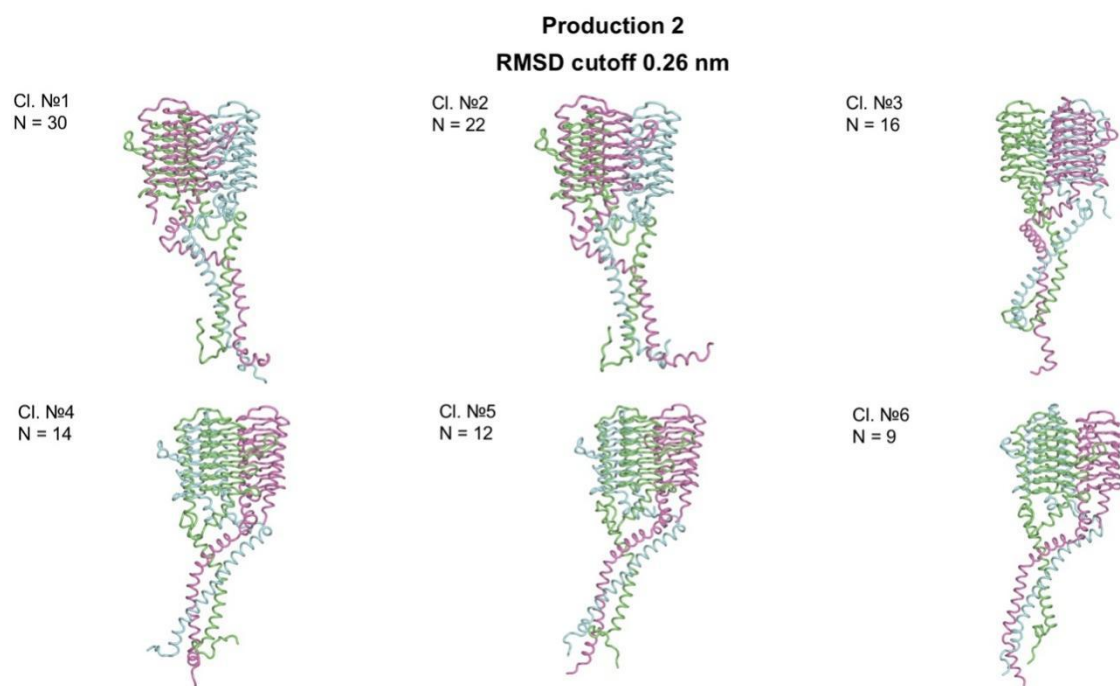
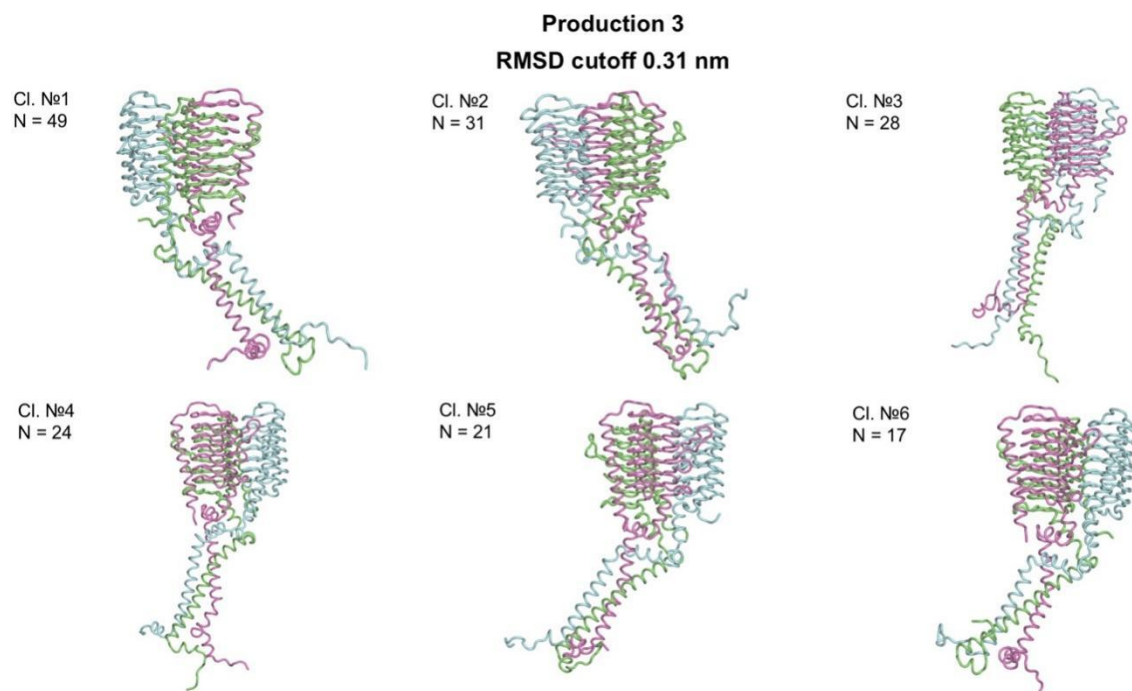


Рисунок П5. Репрезентативные модели ЕсоСАγ внутри кластеров для водной системы. Обозначение Cl соответствует номеру кластера, N - число моделей, входящих в кластер. Модели представлены для третьего запуска длительной траектории.



СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ 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. 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. Барклая, 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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная диссертационная работа стала результатом моего осознанного решения заниматься наукой после окончания медицинского и во многом была моей личной исследовательской инициативой. На этом пути мне посчастливилось встретить людей, без которых её выполнение было бы невозможно.

Прежде всего выражаю искреннюю благодарность Вячеславу Адамовичу Колбу за приглашение в аспирантуру и возможность начать свой путь в фундаментальной науке.

Особую благодарность хочу выразить Азату Габдрахмановичу Габдулхакову за то, что познакомил меня с миром структурной биологии и научил работать с пространственными структурами белков. Его опыт и готовность делиться знаниями оказали огромное влияние на моё профессиональное становление.

Искренне благодарю моего научного руководителя Олега Станиславовича Никонова за консультации, наставничество, поддержку исследовательских инициатив и помощь в формировании научного мышления.

Отдельная благодарность Софии Станиславовне Борисевич за то, что открыла для меня новые возможности вычислительных методов и помогла увидеть, насколько мощным инструментом они могут быть для решения биологических задач.

Благодарю Станислава Калинина за вдохновение, поддержку и неизменный интерес к научным идеям, которые помогали двигаться вперёд даже в самые непростые периоды работы. Отдельно выражаю благодарность Алексею Петровичу Корепанову за постоянную готовность делиться опытом, внимательное отношение к деталям и честный взгляд на возникающие научные вопросы.

Выражаю признательность Андрею Егоровичу Щекотихину (ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе») за совместные исследования. Хотя результаты этой работы не вошли в настоящую диссертацию, они стали важным этапом моего профессионального развития и заложили основу для новых научных направлений.

И наконец, самые тёплые слова благодарности адресованы моей семье. Моему мужу — за любовь, терпение и возможность довести эту работу до конца. Моей сестре — за то, что когда-то открыла для меня дорогу в науку. Моей маме — за постоянную поддержку, веру в меня и готовность быть рядом на каждом этапе этого пути.

Спасибо всем, кто разделил со мной этот путь.