

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ)
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Изотова Екатерина Дмитриевна

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

1.5.2 - биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, доцент
Акберова Наталья Ивановна

Казань–2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Кремний и его роль в жизнедеятельности организмов.....	13
1.2 Структурообразование кремниевого скелета у многоклеточных животных типа губки (Porifera).....	15
1.3 Пространственная структура и свойства силикатеина- α	20
1.4 Сериновые протеазы. Аминокислоты активного центра.....	24
1.5 Модели ферментативного катализа силикатеина- α	31
1.6 Роль переноса протона при ферментативном катализе.....	34
1.7 Активность и субстратная специфичность силикатеина- α	37
1.8 Конденсация и олигомеризация природных субстратов силикатеина- α в водной среде.....	40
1.9 Олигомерное разнообразие кремниевых кислот в водном растворе. Методы идентификации.....	45
1.9.1 Эмпирические методы.....	46
1.9.2 Теоретические расчеты.....	50
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	59
2.1 Молекулярные модели.....	59
2.2 Поиск конформаций активного центра силикатеина- α для инициации процесса олигомеризации кремниевых кислот.....	60
2.2.1 Подготовка молекулярной модели структуры силикатеина- α	60
2.2.2 Подготовка модели субстрата - $\text{Si}(\text{OH})_4$	61
2.2.3 Подготовка 8 конформационных изомеров модели каталитической триады силикатеина- α с субстратом $\text{Si}(\text{OH})_4$	61
2.2.4 Расчет энергии связывания и геометрии комплекса каталитическая триада– $\text{Si}(\text{OH})_4$	63

2.2.5 Расчет и построение поверхности потенциальной энергии перемещения H^+ вдоль вектора водородной связи каталитическая триада - $Si(OH)_4$	63
2.3 Поиск областей связывания силикатеина – α с избранными олигомерами кремниевых кислот.....	64
2.3.1 Подготовка молекулярных моделей силикатеина- α	64
2.3.2 Подготовка моделей природных субстратов силикатеина- α	65
2.3.2.1 Построение системы с разной долей ортокремниевой кислоты, растворенной в воде.....	65
2.3.2.2 Моделирование процесса олигомеризации кремниевых кислот в водном растворе.....	66
2.3.2.3 Оценка воспроизводимости геометрических параметров образующихся олигомеров кремниевых кислот.....	68
2.3.2.4 Алгоритм поиска и кластеризации олигомеров кремниевых кислот в траектории МД.....	70
2.3.2.5 Анализ олигомерного разнообразия кремниевых кислот.....	70
2.3.2.6 Оптимизация моделей субстратов кремниевых кислот методами квантовой химии.....	71
2.3.3 Молекулярный докинг олигомеров кремниевых кислот в силикатеин- α	71
ГЛАВА 3. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ СИЛИКАТЕИНА-А ДЛЯ НАЧАЛЬНОГО ЭТАПА ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ $Si(OH)_4$	73
3.1 Построение модели $Si(OH)_4$	73
3.2 Оценка подвижности силикатеина- α в ходе МД.....	73
3.3 Характеристика стационарных состояний каталитической триады силикатеина- α субстратом и без него.....	74
3.4 Обсуждение результатов квантово-химических расчетов комплекса каталитическая триада силикатеина- α и $Si(OH)_4$	82
3.5 Поверхность потенциальной энергии переноса H^+ в пределах электроотрицательной пары атомов аминокислотных остатков каталитической триады силикатеина– α и молекулы $Si(OH)_4$	84

ГЛАВА 4. ОБЛАСТИ СВЯЗЫВАНИЯ СИЛИКАТЕИНА-А С КРЕМНИЕВЫМИ КИСЛОТАМИ.....	89
4.1 Определение олигомерного разнообразия кремниевых кислот в водном растворе методом МД.....	89
4.1.1 Количественная оценка образования олигомеров кремниевых кислот.....	89
4.1.2 Пространственная изомерия кремниевых кислот.....	93
4.1.3 Оценка стабильности образующихся олигомеров кремниевых кислот.....	103
4.1.4 Избранные олигомеры кремниевых кислот для проведения молекулярного докинга.....	107
4.2 Оценка качества и подвижности молекулярной модели силикатеина- α для поиска областей связывания.....	108
4.3 Поиск областей связывания силикатеина- α с избранными кремниевыми кислотами.....	111
4.4 Белок-белковый докинг силикатеина- α	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	118
ВЫВОДЫ.....	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	124
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	149
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	151
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	153

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ — аденозинтрифосфат
- АЦ — активного центра
- ДФФ — диизопропилфторфосфатом
- МД — молекулярная динамика
- ППЭ — поверхность потенциальной энергии
- РНК — рибонуклеиновая кислота
- ТЕОС (ТЭС, TEOS) — тетраэтоксисилан
- ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия
- ЯМР — ядерно магнитный резонанса
- DFT — метод теории функционала плотности
- РА (клан белков) — химотрипсин-родственные протеазы
- PCM — модели поляризованного континуума
- PDF (Powder Diffraction File) — база данных неорганических и органических дифракционных данных, используемых для идентификации фаз и материалов (подскажите как по-русски)
- PMSF — фенилметилсульфонил фторид
- PVI — поли-имидазол
- TAA — тетраалкиламмония
- TBDMS (tert-Butyldimethylsilyl ethers) — трет-бутил диметил силиловый эфир
- TIPS (triisopropylsilane) — триизопропилсилан
- TMS-OH — триметилсилан
- TMA — тетраметиламмония

ВВЕДЕНИЕ

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

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

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

Механизм ферментативного катализа силикатеина- α до сих пор остается дискуссионным в области молекулярной биофизики белков (Craik *et al.*, 1987; Povarova *et al.*, 2018; Görlich *et al.* 2020). В основе предложенных моделей

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

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

Основными вопросами молекулярной биофизики силикатеина- α являются оценка субстратного разнообразия кремниевых кислот в водном растворе, выявление механизма взаимодействия силикатеина- α с природными субстратами, а так же получение информации о начальной конфигурации активного центра силикатеина- α и областей взаимодействия природных субстратов с поверхностью

силикатеина- α . Решение этих вопросов приблизит к разработке технологически направленного биотехнологического процесса получения кремниевых структур.

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

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

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

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

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

полужизни силанольных и силоксановых связей олигомеров кремниевых кислот в рамках использования реакционного силового поля FG.

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

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

сливаются в одну область с общими аминокислотными остатками (АО): Glu132, Ser131 (АЦ), Asp134, Lys130 и Ser298.

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

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

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

Личный вклад диссертанта в исследования. Приведенные в работе данные получены при личном участии соискателя на всех этапах работы, включая составление плана исследования, проведение экспериментов, обработку полученных данных и оформление публикаций. Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора или в соавторстве с Тарасовым Д.С. (совместная реализация силового поля FG на графических процессорах); Акберовой Н.И. и Алишевой Д. И. (совместное

построение структуры и проведение молекулярной динамики (МД) силикатеина- α); Акберовой Н.И. (предсказание структур силикатеина- α и пре-силикатеина- α); Чаплановым В.В. (квантово-химические расчеты избранных олигомеров); Акберовой Н.И. и Рудаковой М.А. (обсуждение полученных результатов).

Положения, выносимые на защиту.

- 1) Реакционное силовое поле Feuston and Garofalini может быть использовано для широкомасштабного моделирования реакций олигомеризации кремниевых кислот в водном растворе.
- 2) Полученный методом молекулярной динамики частотный спектр и разнообразие кремниевых кислот сопоставимы с данными эксперимента.
- 3) Полностью депротонированная форма имидазольного кольца His является потенциально значимой для активации молекулы $\text{Si}(\text{OH})_4$, при этом конфигурации, в которых протонирован только атом πN , также могут иметь существенное значение при каталитической конденсации кремниевых кислот силикатеином- α независимо от поворота имидазольного кольца.
- 4) Кремниевые кислоты с длиной цепочки $\text{Si}_n = 1-6$ связываются со структурой силикатеина- α и пре-силикатеина- α в трех областях: Asp6, Ser25, Thr94 и Asp68, Thr329 и Ser131, соответственно. Для лигандов $\text{Si}_n = 1-4$ максимальная аффинность для региона вблизи Ser25 (-16,1 ккал/моль) и Ser131 (-10,96 ккал/моль). Лиганды большего размера $\text{Si}_n = 5-6$ начинают эффективно связываться с областью вблизи Asp6 (силикатеин- α) и с областью Thr329 (пре-силикатеин- α).

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

Квантово-химическое моделирование избранных олигомеров и конфигураций активного центра силикатеина- α выполнено с использованием

методов теории функционала плотности (DFT) с применением расширенного обменного функционала X3LYP и B3LYP в базисных наборах 6-31G(d)/6-311++G(2d, p), с добавлением диффузных s- и p-функций на тяжёлые атомы и 2p и 1d – на атомы водорода.

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

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

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

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 223 источника, из них 214 зарубежных. В работе представлено 2 таблицы и 42 рисунка и приложение А-В.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Кремний и его роль в жизнедеятельности организмов

Несмотря на широкую распространенность кремния (Si) в земной коре 27.6% (Pier, 1979) 29% (Pilgrim *et al.*, 2018), он не встречается в свободном состоянии. Среди соединений кремния с кислородом наиболее распространены оксид кремния (II) SiO и (IV) SiO₂ — кремнезем (Finger and Hazen, 2000). Процесс образования кремниевых кварцевых структур живыми организмами, получил название — биосилификация (Gröger *et al.*, 2008; Uriz *et al.*, 2003, Müller *et al.*, 2006; Ikeda *et al.*, 2021). Данный процесс является объектом интенсивных научных исследований на протяжении последних 50 лет, в первую очередь вследствие его потенциальной практической значимости. Кроме того, биосилификация протекает при и низких температурах от 4°C до 40°C (Belton *et al.*, 2010) и концентрациях растворимых соединений кремния от 2 — 120 мкмоль/кг воды (Krom *et al.*, 2014), живые организмы способны производить кристаллические кварцевоподобные структуры с существенной твердостью 800 МПа и пределом упругости (эластичности) 25 ГПа (Müller *et al.*, 2008).

Существующий в природе цикл трансформации кремния остается одним из самых мало изученных. Общий мировой цикл диоксида кремния в основном коррелирует с кинетикой выветривания и биогенного поглощения (Krom *et al.*, 2014; Sarai *et al.*, 2021). Многие пути трансформации и переноса кремния включают растворение кремнезема и силикатов, а также конденсацию молекул кремниевой кислоты с образованием различных типов экзоскелетов водорослей, богатых кремнеземом, морских стекла, глины и минералов (Auger *et al.*, 2011; Otzen, 2012). Огромное количество кремниевой кислоты (примерно 10¹³ тонн) существует в водах мирового океана и играет важную роль в биотических и абиотических процессах (Tréguer *et al.*, 1995). Организмы, от низших эукариот до растений используют его как один из минералов, обеспечивающих опорную,

защитную и многие другие функции (Perry, 2000). Например, отложения полимеров кремниевых кислот были обнаружены в составе клеточных стенок многих растений, так для рода рис (*Oryza sativa*) в составе клеточной стенки и в устьицах обнаружено высокое содержание кремниевых кислот. Считается, что это обеспечивает резистентность организма к болезням, уменьшает транспирацию (испарения воды через устьица) и важно для формирования биоминерализованных клеточных структур (Annenkov, Danilovtseva, 2017).

Для родов губок *Demosponge* и *Hexactinellid* (стеклянные губки) спикулы выполняют структурообразующую функцию, критичную для их жизнедеятельности. Диатомовые водоросли способны образовывать структурные элементы (крышечку и коробочку), улавливая растворенные кремниевые кислоты, которые стабилизируют клеточную стенку при митотическом делении (Annenkov, Danilovtseva, 2017). Клеточный аппарат диатомовых водорослей, ответственный за биосилицификацию, включает семейство мембранных пермеаз, которые распознают и активно транспортируют растворимый предшественник биокремнезема - кремниевую кислоту. Однако, молекулярная основа транспорта кремниевой кислоты остается неясной. Наиболее вероятная функция биогенного кремнезема в одноклеточных организмах, по-видимому, заключается в укреплении клеточной стенки (Simpson and Volcani 1981; Annenkov and Danilovtseva, 2017). В целом об образовании биогенного кремнезема, в отличие от минералов кальция, которые присутствуют в костной ткани и зубах млекопитающих, в панцирях моллюсков, известно относительно мало. Недавние данные свидетельствуют о том, что кремний может также вносить вклад в другие формы биоминерализации, такие как кальцификация кокколитофоридов (Durak *et al.*, 2016) или формирование костей позвоночных (Foster *et al.*, 2015). Кроме того, кремний может играть метаболическую роль внутри клетки, хотя это менее четко определено (Ye *et al.*, 2013). Недавно определили, что морские пикоцианобактерии *Synechococcus* способны накапливать значительные количества кремния (Baines *et al.*, 2012).

Таким образом, способность к биологической переработке кремнезема является постоянной составляющей жизнедеятельности многих живых организмов. Поэтому понимание механизмов биосилификации силикатов позволит в большей степени установить роль кремния как для отдельных организмов, так и в глобальных биогеохимических циклах.

1.2 Структурообразование кремниевого скелета у многоклеточных животных типа губки (Porifera)

Porifera (Губки) - филогенетические относятся к одному из самых ранних типов низших многоклеточных животных *Metazoa*, появившиеся в позднем протоэроэе (Veremeichik *et al.*, 2011; Görlich *et al.*, 2020), состоящий из более чем 7400 видов. Минеральный скелет губок двух классов (*Porifera*), *Demospongiae* и *Hexactinellida*, состоит из кремнезема, тогда как третий класс, *Calcarea*, имеет скелет из карбоната кальция (Veremeichik *et al.*, 2011).

Есть предположение, что тип Porifera является единственно существующим типом животных, максимально близких к предку многоклеточных животных (Лавров и Косевич, 2014). Предположительно, что эволюционными предками родов губок *Demospongiae* и *Hexactinellida* могли выступать одноклеточные жгутиконосцы, образовавшие колонии (Ehrlich *et al.*, 2010). Структурообразующими элементами минеральных губок являются - спикулы (Uriz *et al.*, 2003, Müller *et al.*, 2006; Ehrlich *et al.*, 2010). Неорганическая кремнеземная фаза кремнистых спикул содержит 6-13% воды, что дает приблизительную формулу $(\text{SiO}_2)_{2-5} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Veremeichik *et al.*, 2011). Так кремнистые спикулы морской губки *Tethya aurantia* составляют около 75% от всего сухой массы организма (Brutchey and Morse, 2008).

Спикулы губок представляют ламеллярную структуру (кремниевые цилиндры), жесткость которой составляет 800МПа и эластичность 25 Гра, для спикул *M. Chuni* (Müller *et al.*, 2008, 2). Между кремниевыми слоями располагаются органические волокна — это белки, протеогликаны,

гликопротеиды, гликополисахариды (Arey *et al.*, 2015) (рисунок 1.1). Центральный слой спикулы — получил название — аксиальный филамент (Schröder *et al.*, 2016). Варьируя процентное соотношение белков, образующих органические волокна, можно добиться различного уровня эластичности, материалов. Так если органическое волокно, будет построено только из силикатеина, то эластичность кремниевых структур составит 17 ± 4 МПа, при построении органического волокна из силикатеин:силинтафин -1, в соотношении 1:1 эластичность возрастет примерно в 2 раза и составит 38 ± 6 МПа, при увеличении доли силикатеина (соотношение силикатеин:силинтафин-1, 4:1), эластичность так же возрастает до 61 ± 8 МПа (Schröder *et al.*, 2012).

Структурообразование спикул является очень эффективным процессом, включающим следующие этапы: образование биокремнезема, уплотнение геля с выделением молекул воды с образованием небольших упорядоченных фрагментов, которые потом сливаются в биосинтезированный прочный кремниевый материал (Schröder *et al.*, 2016).

Архитектура спикул гигантских стеклянных кремниевых губок (длина которых может достигать 3-х метров) сходна с оптическими волокнами, применяющимися в телекоммуникации (Wang *et al.*, 2009, Schröder *et al.*, 2016). Спикулы принимают участие в передаче нервных импульсов, спектр передачи сигнала по спикуле наблюдается в диапазоне 620-1250нм (Wiens *et al.*, 2010). Кроме того, идентифицированы светогенерирующие ферменты, это люциферазы, с эмиссией в диапазоне 450-650нм (Müller *et al.*, 2009) и криптохромы (Müller *et al.*, 2010, 2). Поэтому, губки обладают высокой светочувствительностью и способны к абсорбции и эмиссии света (Müller *et al.*, 2010, 2).

Динамику роста и созревание спикул удалось проследить, благодаря созданию клеточной культуры (Riesgo *et al.*, 2015). Отмечено, что формирование спикулы начинается внутриклеточно, внутри специализированных клеток — склероцитов (рисунок 1.1,в). Формирование кремневой оболочки спикул начинается внутри специальных визикул (силикасом), в которые доставляются

кремневые кислоты. Биокремниевый материал спикул представляет собой быстро растущий аксиальный цилиндр, получаемый из наноразмерных кремниевых частиц, диаметром 50-200 нм (Müller *et al.*, 2010). Наибольший размер олигомеров из которых происходит построение кремниевого каркаса, варьирует в диапазоне 2-4 нм (Belton *et al.*, 2010).

В работе Wang с соавторами отмечает прирост спикулы диаметром 15мм за сутки в длину на 200-350мм (Wang *et al.*, 2014). В другой работе продемонстрировали, что формирование спикул происходит быстро, так для спикулы длиной 190 мкм и диаметром от 6 до 8 мкм при температуре 21°C всего за 40 часов (Riesgo *et al.*, 2015).



Рисунок 1.1 — Схема продольного среза спикулы (а); Срез склероцита стеклянных губок, ТЭМ (б); Схема формирования спикулы (в), где scl — склероцит, sp — спикула, sis — силикасома, ac — аксиальный филамент, fi — филамент, col — коллаген, sil — силикатеин, lec - лектины (Wang *et al.*, 2012, Müller *et al.*, 2014)

Образующаяся вода в ходе полимеризации эффективно выделяется через интегральные протеиновые белковые комплексы — аквапорины (один из идентифицированных - это аквапорин-8, который имеет регистрационный номер EMBL FR773712). Размер каналов 1-2 нм, на основе данных трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), однако размер этих каналов в других организмах 20-30 нм (Wang *et al.*, 2011). Активность аквапоринов регулируется

концентрацией ионов Mn^{2+} . Ингибирование каналов приводит к нарушению морфологии спикул, за счет уменьшения твердости образующихся силикатов (Wang *et al.*, 2011, Mülle *et al.*, 2014). Рост и развитие спикулы до ~ 5 мкм происходит внутриклеточно. Окончательное формирование спикул происходит внеклеточно до 150–320 мкм в длину. В ранее проведенных работах продемонстрировано, что формирование спикул является энергетически зависимым процессом (АТФ). В частности внутри осевого канала локализуется высокая концентрация фосфагенкиназы (аргинин киназа, ArgK), активность которой положительно зависит от концентрации кремневых кислот (Wang *et al.*, 2012).

В состав белкового компонента спикулы входят: силикатеин, силинтафин-1 (Mr 43кДа), силинтафин-2, галектин, глассин и гликопротеинами — муцины (Müller *et al.*, 2014). Силинтафин-1 выступает в роли амплификатора ферментативной активности силикатеина, а также взаимодействуя с силикатеином, обеспечивает структурную основу и стабилизацию органических тяжей в процессе роста спикул (Wiens *et al.*, 2009). Примечательно, что силинтафин-1 не имеет известных гомологов, но данный белок содержит плекстрин-гомологичный домен (РН — высоко консервативный домен, состоящий из ~ 120 аминокислотных остатков, входящий в состав протеинкиназ (одна из функций которых заключается во внутриклеточной передаче сигнала) (Таганович с соавт., 2016). Известно, что силинтафин-2 также взаимодействует с силикатеином (Wiens *et al.*, 2011), что придает дополнительную жесткость кремниевым структурам за счет связывания ионов Ca^{2+} (Müller *et al.*, 2011). В ряде работ продемонстрирована интересная особенность, что ряд глубоководных губок семейства *Rosellidae* (класс *Hexactinellida*) не содержат генов силикатеина, в то время наличие коллагена и хитина в скелетных формах показали хорошую кремний полимеризующую активность (Veremeichik *et al.*, 2011). Связывание силикатеина с еще одними факторами биосилификации - муцинами (Dubinsky *et al.*, 2010) приводит к формированию комплекса с большой концентрацией ОН-

групп на поверхности. Благодаря такому комплексу на начальной стадии гелеобразования обеспечивается стабильность гидратной оболочки растущей спикулы. Еще одним представителем факторов биосилификации является фибриллярный белок галектин. Совместно с силикатеином они образуют аксиальный филамент, вокруг которого тонкими пластинами формируются кремниевые скелетные элементы (Schröder *et al.*, 2006). Более того, известно, что галектин в присутствии ионов Ca^{2+} способен заменять фазовое состояние кремниевых кислот из золя в гель (Müller *et al.*, 2014). Кроме этого, в состав органической части спикулы входит белок глассин, который при нейтральном значении pH, в диапазоне pH 6-8, увеличивает полимеризационную активность всего пула ферментов биосилификации (Shimizu *et al.*, 2015). Глассин имеет связывающий домен и два центра богатых гистидином: первый - в His/Asp сегменте, расположенном с N-конца белка; второй - в His/Trn сегменте — на C-конце. Глассин не имеет известных гомологов (Shimizu *et al.*, 2015). Недавно было обнаружен еще один кремнеполимеризующий белок, названный пергамин. Он был выделен из скелета морской губки *Euplectella aspergillum* (род *Hexactinellid*). Рекомбинантный пергамин демонстрирует кремнеполимеризующую активность при комнатной температуре и pH 6-8 *in vitro*. Предполагается, что его каталитическая активность возникает в результате взаимодействия имидазольного кольца His с кремниевыми кислотами, что приводит к осаждению кремнезема (Liang *et al.* 2009) .

Основную роль в образовании кварцподобных спикул губок отводят белку – силикатеину. Предполагается, что силикатеины одновременно выполняют ферментативную роль в биоконденсации кремниевых кислот и структурно-направляющую функцию, благодаря образованию фибрилл - основы для депозиции кремниевых полимеров (Müller *et al.*, 2014).

1.3 Пространственная структура и свойства силикатеина- α

Силикатеины были выделены и изучены на большом разнообразии губок (Shimizu *et al.*, 1998, Morse, 1999, Shimizu *et al.*, 2015, Müller *et al.*, 2007, Görlich *et al.*, 2020). При изучении морской губки *Tethya aurantium* в аксиальном филamente спикулы были идентифицированы три паралогичных гена (дублицированные фрагменты одного гена с последующей дивергенцией) синтеза силикатеина, это: силикатеин- α (29 кДа), силикатеин- β (28 кДа), силикатеин- γ (27 кДа) в соотношении 12:6:1 (Shimizu *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2014; Wiens *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012). Силикатеин у *Hexactinellid* подвергается посттрансляционным модификациям, с образованием 5 фосфо — изоформ (Müller *et al.*, 2008).

Следует отметить, что наличие силикатеина характерно только для классов *Hexactinellida* и *Demospongia*, в то время как данные белки отсутствуют у представителей классов *Carcarea* (известковые спикулы) (Riesgo *et al.*, 2015) и *Homoscleromorpha* (Maldonado *et al.*, 2007). Однако некоторые представители классов *Hexactinellida* и *Demospongia*, несмотря на наличие генов силикатинов не способны образовывать структурные кремниевые элементы (Riesgo *et al.*, 2015).

Сравнение аминокислотной последовательности силикатеина с другими белками показало их гомологичность катепсинам L (Smith S.M., 1989; Fairhead M., 2008) и консервативность аминокислотных остатков активного центра: His и Asp, с сохранением 6 остатков цистеина, ответственных за образование внутримолекулярных дисульфидных связей (Shimizu *et al.*, 2015). В то время как аминокислотный остаток Ser у некоторых представителей силикатеинов может замещаться на Cys подобно катепсинам (Veremeichik *et al.*, 2011). Установление родства и взаимосвязь силикатеинов и катепсинов основывается на стандартных филогенетических маркерах: субъединица I цитохром- с оксидазы и 28S и 18S rRNA (Cárdenas *et al.*, 2012, Nosenko *et al.*, 2013), а также филогенетический анализ аминокислотной последовательности (Riesgo *et al.*, 2015).

Катепсин L - протеолитический фермент, относящийся к классу цистеиновых протеаз, в основном локализован в лизосомах клетки (Krasko *et al.*, 2000), рН оптимум которых лежит в кислой среде (Turk *et al.*, 2001). Отдельный большой интерес представляют лизосомальные катепсины, в связи с тем, что при нарушении их роли в метаболизме клетки и организма может привести к широкому кругу патологий (Rodriguez-Franco *et al.*, 2012). Так у млекопитающих функция катепсинов B и L заключается в протеолизе коллагена I в костной ткани, а также пептидных гормонов и антигенов. Для типа членистоногих катепсин L участвует в линьке (Liu *et al.*, 2006). Для губок функция катепсина L и B остается до конца не изучена (Müller *et al.*, 2007).

Отмечено, что активность катепсина L млекопитающих сильно снижается, при рН среды выше нейтральной (Gunc *et al.*, 1999), однако катепсин L креветок, имеет более широкий диапазон рН активности (Aoki *et al.*, 2004). Особенности структуры катепсина L креветок выражены в изменении структуры активного центра, это: His, Ala и Asn, против каталитической триады катепсина L млекопитающих, это: His, Cys, Asn и делеция четырех аминокислотных остатков тяжелой инвариантной цепи катепсина L E286 — E289 (Gunc *et al.*, 1999). Интересно, что аминокислоты, фланкирующие His активного центра катепсина L креветки и силикатеина губок идентичны, это: Ala и Asn (Fairhead *et al.*, 2008). Авторами высказывают предположение, что наличие инвариантной петли приводит к изменению конформационной структуры белка и как следствие изменение протеазной активности.

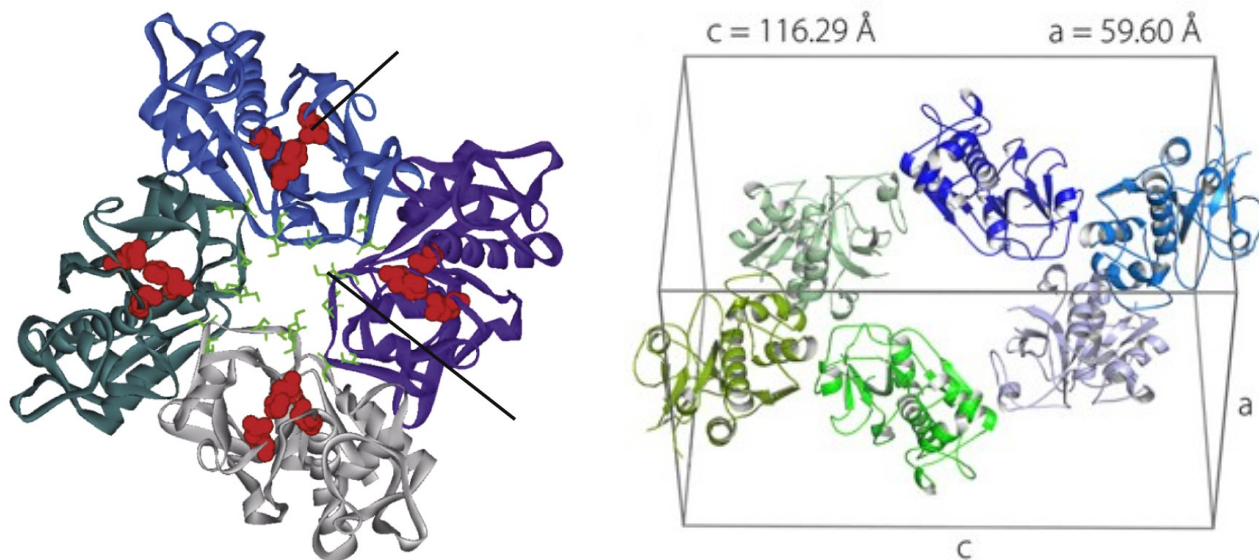
Рядом авторов высказывается предположение, что модификация гена катепсина L (для типа Porifera) привела к образованию новой ферментной группы белков, получивших название — силикатеины (Shimizu *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 2015).

Основные различия заключаются в наличии последовательности в петле рядом с предполагаемым активным центром, которая отсутствует в оригинальном

катепсине L (Smith *et al.*, 1989) и большого количества гидроксированных аминокислотных остатков, а именно Ser, Thr, Tyr.

Однако, работы Ки с соавторами демонстрируют, что катепсин L, кроме протеолитической активности обладает и кремний полимеризующей активностью (Tanizawa *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 2014). Рекомбинантный фермент, содержащий в активном центре Cys, проявлял полимеризующую активность в отношении диоксида кремния. Сканирующая электронная микроскопия выявила гексагональные, октаэдрические и бета-тридимитовые кристаллы (Kamenev *et al.*, 2015).

По одной из схем, предложенной группой Schröder силикатеины образуют комплекс, построенный из четырех гомологичных α - субъединиц, активный центр которых обращен во внутрь образованной полости, каждая из которых обладает идентичным активным центром (Schröder *et al.*, 2016) (рисунок 1.2).



а)

б)

Рисунок 1.2 а) — Тетрамерная форма комплекса силикатеина- α (Schröder *et al.*, 2016); б) — Элементарная ячейка расположения силикатеина- α (Görlich *et al.*, 2020)

По другой схеме, полученной методом серийной рентгеновской кристаллографии силикатеины образуют элементарную кристаллическую ячейку, принадлежащую группе симметрии $P3_121$ с $a = 5,96$ нм и $c = 11,63$ нм (Görlich *et*

al., 2020). Следует отметить, что в данной работе исследуемый образец — это комплекс белка и силикатов.

Общим среди двух представленных схем является то, что каждая отдельная субъединица обладает самостоятельной кремний полимеризующей активностью (Schröder *et al.*, 2016; Görlich *et al.*, 2020).

На сегодняшний момент имеется лишь одна третичная структура силикатеина (PDB код 6ZQ3) (Görlich *et al.*, 2020), рисунок 1.3. Третичная структура белка — силикатеина, полученная из спикул морской губки *Tethya aurantium*. Следует отметить, что выделить и кристаллизовать силикатеин в чистом виде до сих пор так и не удалось и авторам пришлось исследовать многочисленные кристаллы, представляющие комплекс белка и силикатов. Структуру силикатеина удалось получить, применив современный метод серийной фемтосекундной кристаллографии (Mishin *et al.*, 2019). Разрешение структуры составило 2,4Å, а для получения было использовано 3608 индивидуальных дифракционных снимков. Структурной моделью служила химерная структура катсиликатеина (PDB код 2VHS), обладающая максимальным сходством первичных аминокислотных последовательностей (Fairhead *et al.*, 2008). Предложенная модель белка реконструирована полностью в диапазоне от Pro3 с N -конца, до Leu218, исключая петлю в диапазоне Ser175 до Gln178. Получившаяся третичная модель белка силикатеина-α имеет среднеквадратичное отклонение от структуры катепсина L (PDB код 1MHW) 0,67Å по 199 положениям Cα атомов (Görlich *et al.*, 2020).

Несмотря на близкую гомологию последовательностей с протеазой катепсина L, силикатеины, не проявляют значимой протеазной или эстеразной активности при тестировании против аналогичных субстратов (Dakhili *et al.*, 2017).

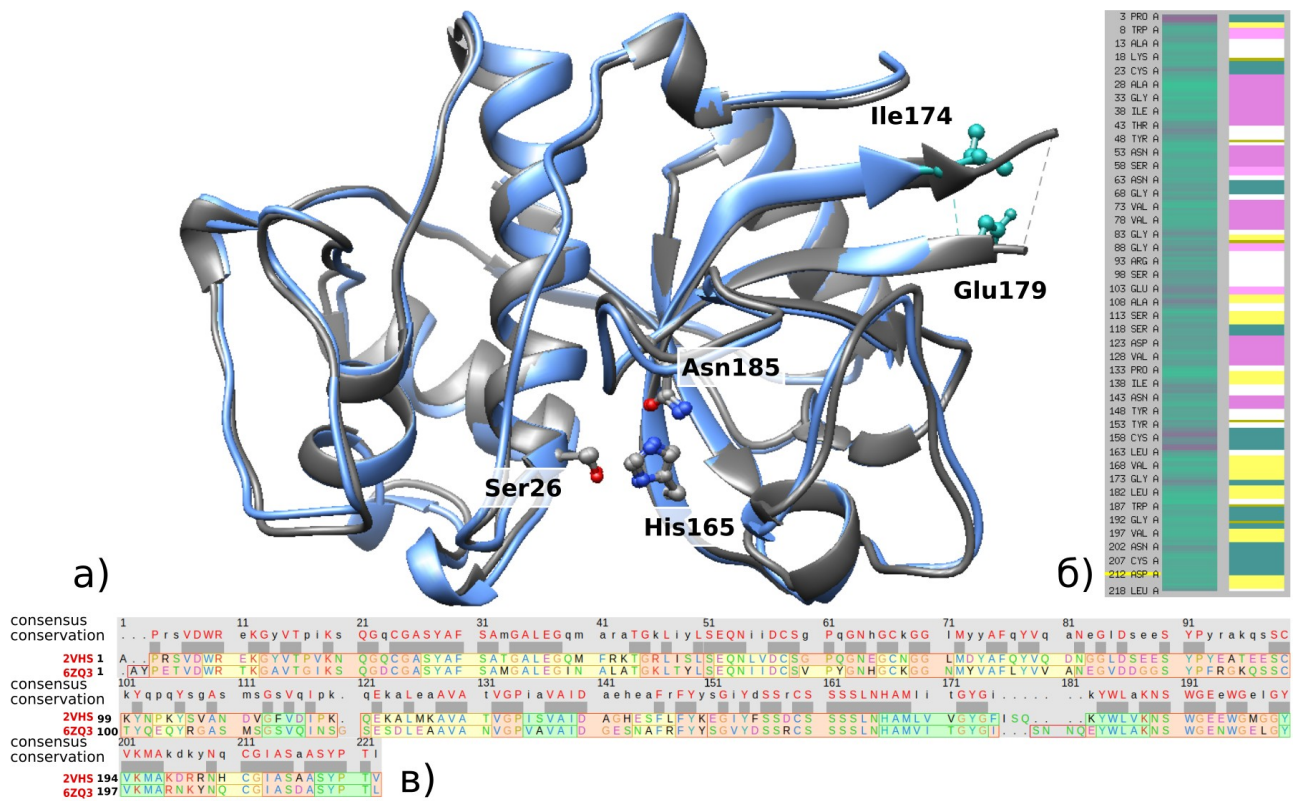


Рисунок 1.3 — Выровненные модели третичной структуры силикатеина-α (PDB код 6ZQ3) (Görlich *et al.*, 2020) и мутантной формы катепсина L (PDB код 2VHS) (Fairhead *et al.*, 2008), где а) — Трехмерные модели 2VHS (серый) и 6ZQ3 (синий); б) — раскладка модели структуры 6ZQ3 на вторичные мотивы; в) — выравнивание первичных аминокислотных последовательностей 2VHS и 6ZQ3

1.4 Сериновые протеазы. Аминокислоты активного центра

Все протеолитические ферменты разделяют, в зависимости от аминокислотного остатка, который входит в состав активного центра, на 7 подклассов: сериновые протеазы, цистеиновые протеазы, аспарагиновые протеазы, треониновые протеазы, глутаматные протеазы, металлопротеиназы и пептидазы с неизвестным типом катализа (Poorani *et al.*, 2019). Кроме того Avram Hershko с соавторами представили треониновую протеазу (Hershko and Ciechanover, 1998), за что в 2004 году удостоились нобелевской премии по химии. По результатам секвенирования в геноме *Homo sapiens* выделили более 500 протеаз что составляет 2% от общего генома (Poorani *et al.*, 2019). Сериновые

протеазы - большой подкласс протеолитических ферментов (Е.С. 3.4.21, примерно, 1/3 от всех известных протеаз), в активном центре которых присутствует аминокислотный остаток Ser.

В базе данных MEROPS представлены данные научных исследований, посвященные протеолитическим ферментам (Rawlings *et al.*, 2018). Одна из наиболее изученных групп протеаз - это химотрипсин-родственные протеазы, которые составляют клан PA в базе данных MEROPS. Клан PA в настоящее время содержит девять семейств цистеиновых протеаз (представляющих протеазы (+) РНК-вирусов (с положительной цепью)) и 14 семейств сериновых протеаз (представляющих протеолитические ферменты эукариот, бактерий, некоторых ДНК-вирусов и эукариотических вирусов (+)РНК). Семейство цистеиновых протеаз С3 подразделяется на восемь подсемейств (С3А – С3Н); семейства сериновых протеаз S1 и S39 делятся на шесть (S1А – S1F) и два (S39А и S39В) подсемейства, соответственно (Mönttinen *et al.*, 2019).

Сериновые протеазы принимают участие в ангиогенезе, в апоптозе, в дифференцировке клеток, в системе свертывания крови, внутриклеточном и внеклеточном протеолизе белков и пептидов, в передаче внутриклеточного сигнала, в иммунном ответе как медиатор воспаления и многих других функциях (Ekić *et al.*, 2008). Нарушение работы сериновых протеаз связывают с возникновением таких патологий как сердечно-сосудистые болезни, болезнь Альцгеймера, рак, аутоиммунные заболевания, гипертония и многие другие (Ekić *et al.*, 2008).

Ферментативный катализ сериновых протеаз

Классическая триада сериновых протеаз представлена тремя аминокислотными остатками, это Ser, His, Asp. К представителям данного подкласса можно отнести хорошо исследованные ферменты, это: химотрипсин, трипсин, эластаза и субтилизин. Кроме данной триады аминокислот в активном центре, также встречаются другие комбинации аминокислотных остатков, среди

наиболее часто встречаемых это: Ser, His, Glu; Ser, His, His или Ser, Glu, Asp. (Puenta *et al.*, 2005).

Каталитическая триада Ser-His-Asp

В классическом ферментативном каскаде реакции каталитической триады Ser/His/Asp, остаток Ser выступает в роли нуклеофила, остаток His — может выступать в роли как кислоты, так и основания, в зависимости от окружения, в то время как остаток Asp — компенсирует частичный заряд, возникающий на His, во время переходных состояний. В 1969 году Дэвид Блоу с соавторами предположил челночный механизм (рисунок 1.4) передачи заряда, путем миграции протона от остатка Ser195 до His57 и от His57 до Asp102 (Blow *et al.*, 1969). Позднее, основываясь на данных дифракции нейтронов и результатах ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (Robillard and Shulman, 1974; Bachovchin, 1985; Kossiakoff and Spenser, 1981) была предложена упрощенная схема катализа, путем переноса H⁺ лишь между О-гидроксильной группы остатка Ser195, N-иммидазольного кольца остатка His 57, положения (τN). Позднее в 2006 году Fodor с соавторами получили серию промежуточных структур (Fodor *et al.*, 2006).

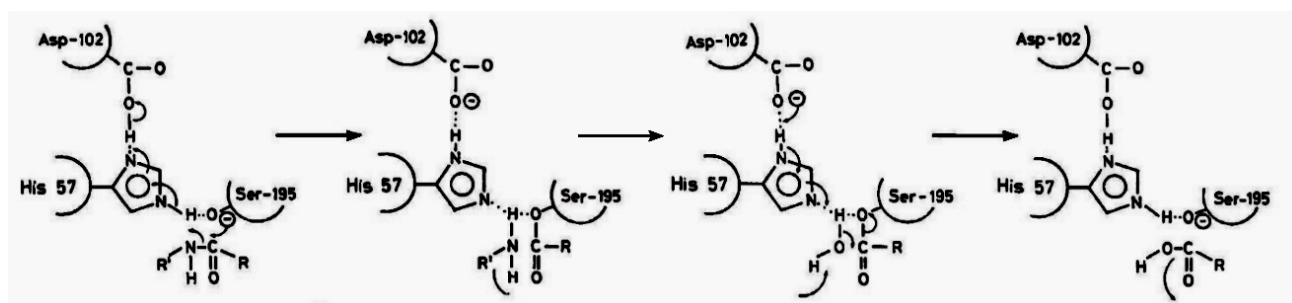


Рисунок 1.4 — Последовательная схема ферментативного механизма сериновых протеаз по Blow, в составе активного центра которых представлены аминокислотные остатки: Ser/His/Asp. Ферментативный механизм включает: А — образование комплекса Михаэлиса-Ментен, Б — образование тетраэдрического посредника 1, В — ацил-ферментный комплекс, Д — высвобождение второго субстрата и восстановление состояния А (Blow *et al.*, 1969)

В изученных механизмах действия сериновых протеаз первый шаг каталитического цикла представлен нуклеофильной атакой кислорода гидроксила

Ser или Thr. Отмечено, что протеазы, содержащие в активном центре аминокислотные остатки Ser и Lys, обладают оптимум активности выше, чем протеазы с каталитической триадой Ser, His, Asp, а то время если аминокислотный остаток His заменить на Glu, то рН оптимум активности фермента понизится (Ekici *et al.*, 2008).

Направленный мутагенез аминокислотных остатков активного центра: Ser, His и Asp приводит к снижению каталитической активности фермента. Так вклад Ser и His оценивается в 1 миллион раз, а Asp в 10 тысяч раз (Corey *et al.*, 1992).

Используя базу данных MEROPS (Rawlings *et al.*, 2018) Ekici с соавторами рассмотрели структуры и механизмы действий протеолитических ферментов. Так ферменты, имеющие классическую каталитическую триаду Ser/His/Asp обладают схожими функциональными структурными областями, а именно: канавка для правильной ориентации субстрата и стабилизации, по средством водородных связей, карман узнавания фермента с субстратом, сама каталитическая триада и оксианионовая «дыра» (Hedstrom, 2002). Последовательность ферментативных этапов отражена на рисунке 1.5. Предполагается, что имидазольное кольцо гистидина частично протонировано, а именно протонирован только азот πN . Протон πN образует водородную связь с депротонированным гидроксилом аминокислотного остатка Asp. Другой азот имидазольного кольца His τN , депротонирован и образует водородную связь с кислородом гидроксила Ser. Разрыв пептидной связи происходит с С-конца, при наличии Arg или Lys в положении P_1^* . Следующий шаг (рисунок 1.5б): на азот τN имидазольного кольца переходит протон H^+ Ser, в результате на кислороде образуется отрицательный заряд, и кислород совершает нуклеофильную атаку на С пептидной связи субстрата. Это приводит к разрушению ковалентной пептидной связи и образованию ковалентного соединения часть субстрата — С пептидной связи — О — Ser активного центра фермента. При этом H^+ молекулы воды образует водородную связь азотом τN имидазольного кольца. Данный комплекс получил название ацил-ферментный комплекс. Последний этап представлен разрывом

ковалентной связи субстрат-фермент, за счет перемещения гидроксила молекулы воды на атом С пептидной связи и H^+ на гидроксил Ser, рисунок 1.5 С-Д.

В пользу существования переходного тетраэдрического состояния 1, (рисунок 1.5б) в ходе ферментативного катализа, говорят данные, рентгеноструктурного анализа с разрешением 1,2 Å (Fodor *et al.*, 2006), что расстояние между β -цепью фермента и субстратом (взаимодействующий фрагмент пептида) укорачивается во время изменения стадий ферментативного катализа (б → в).

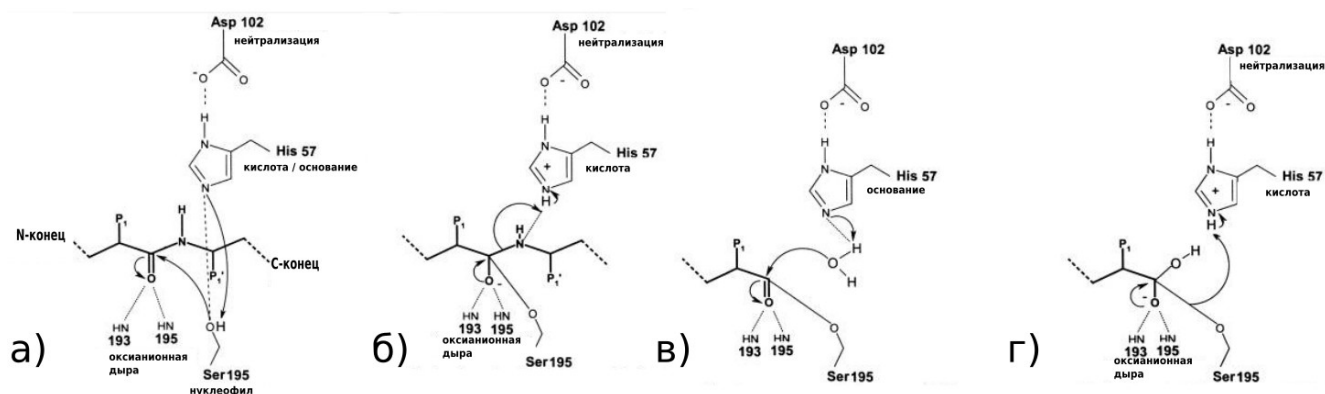


Рисунок 1.5 — Классическая последовательная схема ферментативного механизма сериновых протеаз, в составе активного центра которых представлены аминокислотные остатки: Ser/His/Asp. Ферментативный механизм включает: а — образование комплекса Михаэлиса-Ментен, б — образование тетраэдрического посредника 1, в — ацил-ферментный комплекс, г — образование тетраэдрического посредника 2 (Ekici *et al.*, 2008)

Субтилизин является хорошим примером конвергентной эволюции по отношению к химотрипсину и пепсину. Обладая абсолютно отличной структурой, но активный центр которого представлен также тремя аминокислотными остатками Ser/His/Asp, со сходной протеолитической активностью. Однако последовательность аминокислотных остатков с N — конца иная: Asp/His/Ser и Asn. При проведении направленного мутагенеза аминокислотных остатков His и Ser приводят к снижению активности в 10^6 , а Asp - 10^4 (Carter and Wells, 1988). При увеличении поверхностного заряда субтилизина, увеличиваются рН оптимум

фермента и активность. Так рН оптимум в случае дезаминирования Asn253Asp, Gln256Glu сдвигался с 11 до 10, а при рН 8,5 активность снижается лишь на 10% (Jakob *et al.*, 2013).

Каталитическая триада Ser-His-Glu

К ферментам, содержащим в активном центре остатки аминокислот Ser/His/Glu, относят аспартилдипептидазу из *Salmonella typhimurium* (Hakansson *et al.*, 2000) и LD-карбоксипептидазу из *Pseudomonas aeruginosa*. Следует отметить, что аминокислотный остаток активного центра Ser не ингибируется диизопропилфторфосфатом (ДФФ) и фенилметилсульфонил фторидом (PMSF - phenyl methane sulfonyl fluoride), являющимися классическим инактиваторами сериновых протеаз (Conlin *et al.*, 1994). Также данная последовательность аминокислотных остатков, входящих в состав активного центра, наблюдается в некоторых липазах и экстеразах (Ekici *et al.*, 2008).

Каталитическая триада Ser-His-His

Данная комбинация аминокислотных остатков найдена в активном центре протеиназ цитомегаловирусов. Основная роль этих протеиназ — это участие в созревании белков. Примечательно, что Ser132 ингибируется диизопропилфторфосфатом (ДФФ), как и в случае с воздействием его на классическую каталитическую триаду (Ser/His/Asp) (Conlin *et al.*, 1994). Как показал сайт-направленный мутагенез аминокислотный остаток His63 является критическим для ферментативного катализа протеазы цитомегаловируса человека (Ekici *et al.*, 2008). Второй His157 выполняет роль Asp в «классической» комбинации аминокислотных остатков активного центра и образует водородную связь с His63, замена которого показывает снижение активности лишь в 10 раз, что говорит о достаточности для функционирования активного центра пептидазы цитомегаловируса и двух аминокислотных остатков (Carter and Wells, 1988).

Каталитическая триада Ser-Glu-Asp

В состав активного центра серолизиновых протеаз входят аминокислотные остатки Ser/Glu/Asp, карбоксаамидная группа Glu имеет низкую константу

диссоциации (pK_a), что придает протеазам активность в кислой среде. Одним из представителей является протеаза - кумамолизин, выделенный из бактерии *Alicyclobacillus sendaiensis* (PDB ID: 1T1E), обитающей в термальных кислых источниках. Имеет рН оптимумом 2,0-4,0 и $pK_a = 4,1$ (Tian *et al.*, 2017). Еще одним представителем является лизосомальная трипептидиопептидаза I (так же известная как катепсин С) с оптимумом рН = 6,0.

Каталитическая диада Ser-Lys

Активный центр представлен лишь двумя аминокислотными остатками — это Ser и Lys. Данная диада входит в состав интегральных мембранных белков - сигнальных пептидаз I, осуществляющих удаление N-конца сигнального пептида, после переноса экспортируемого белка через мембрану. Третий аминокислотный остаток His не критичен для проявления ферментативного катализа (Paetzel *et al.*, 2002). Проведенный рентгеноструктурный анализ трехмерной структуры взаимодействия сигнального пептида I *E. coli* с ингибитором (β - лактамное производное, 5S-penam) показал ингибирование путем образования ковалентной связи Ser90 с 5S-penam, в то время как аминокислотный остаток Lys145 располагался в пределах $2,8\text{\AA}$ от Ser90 и порядка $7,5\text{\AA}$ от остальных аминокислотных остатков (Paetzel *et al.*, 2002). Направленный мутагенез показал, что наличие аминокислотного остатка Ser способствует 1000 кратному возрастанию активности фермента. pK_a аминокислотного остатка Lys составляет 8,7, что приводит к рН оптимум этого фермента к 9 (Paetzel *et al.*, 2002).

Еще одной группой ферментов, в активном центре которых присутствуют два аминокислотных остатка Ser и Lys, являются UmuD, LexA и λ -репрессор (Paetzel and Woodgate, 2004). Типичные ингибиторы классической каталитической триады ДФФ и PMSF не связываются с Ser активного центра и не ингибируют данную группу ферментов (Slilaty and Little, 1987).

Следующая группа протеаз — Lon протеазы, которые участвуют в протеолизе неправильно свернувшихся или агрегированных белков, используя для этого энергию АТФ. Энергия АТФ не затрачивается при протеолизе коротких

пептидов (Chung and Goldberg, 2004). Так же продемонстрировано отсутствие ингибирования ДФФ и PMSF на Lon протеазы (Chung and Goldberg, 2004).

C-концевые пептидазы также осуществляют катализ, используя два аминокислотных остатка (Ser и Lys). Так фермент Tsp (tail-specific protease) участвует в деградации помеченных белков, содержится в периплазме грамотрицательных бактерий и области клеточной стенки у грамположительных бактерий. Оба этих аминокислотных остатков активного центра являются критическими для функционирования фермента и высоко-консервативны (Keiler and Sauer, 2001). Tsp имеют широкий диапазон pH оптимума от 5,0 до 9,0 (Keiler and Sauer, 2001).

Каталитическая диада Ser-His

К данному подклассу можно отнести ромбоидные протеазы, состоящие из 7 трансмембранных доменов (для прокариот 6). Аминокислотные остатки, вовлеченные в катализ, погружены в липидный бислой и участвуют в регулируемом внутримембранном протеолизе (Urban *et al.*, 2011) с pH оптимумом около 6,0 (Arutyunova *et al.*, 2014). Нуклеопорины, также имеют два аминокислотных остатка Ser и His в структуре активного центра. Расположены в мембране клеток эукариот и образуют комплексы ядерных пор, транспортирующих макромолекул в цитоплазму клетки, наиболее распространенный комплекс р62. Направленный мутагенез His, показал снижение протеолитической активности лишь на 50% (Kim *et al.*, 2014).

1.5 Модели ферментативного катализа силикатеина- α

Механизм взаимодействия активного центра силикатеина с субстратом остается спорным. В первых двух предложенных механизмах протекания ферментативной реакции активный центр представлен двумя аминокислотными остатками, это Ser25 и His163. Депротонированная форма N(pros) имидазольного кольца His образует водородную пару с водородом гидроксила Ser. Третий механизм предполагает, что в состав активного центра входит еще и Gln19 (рисунок 1.6)

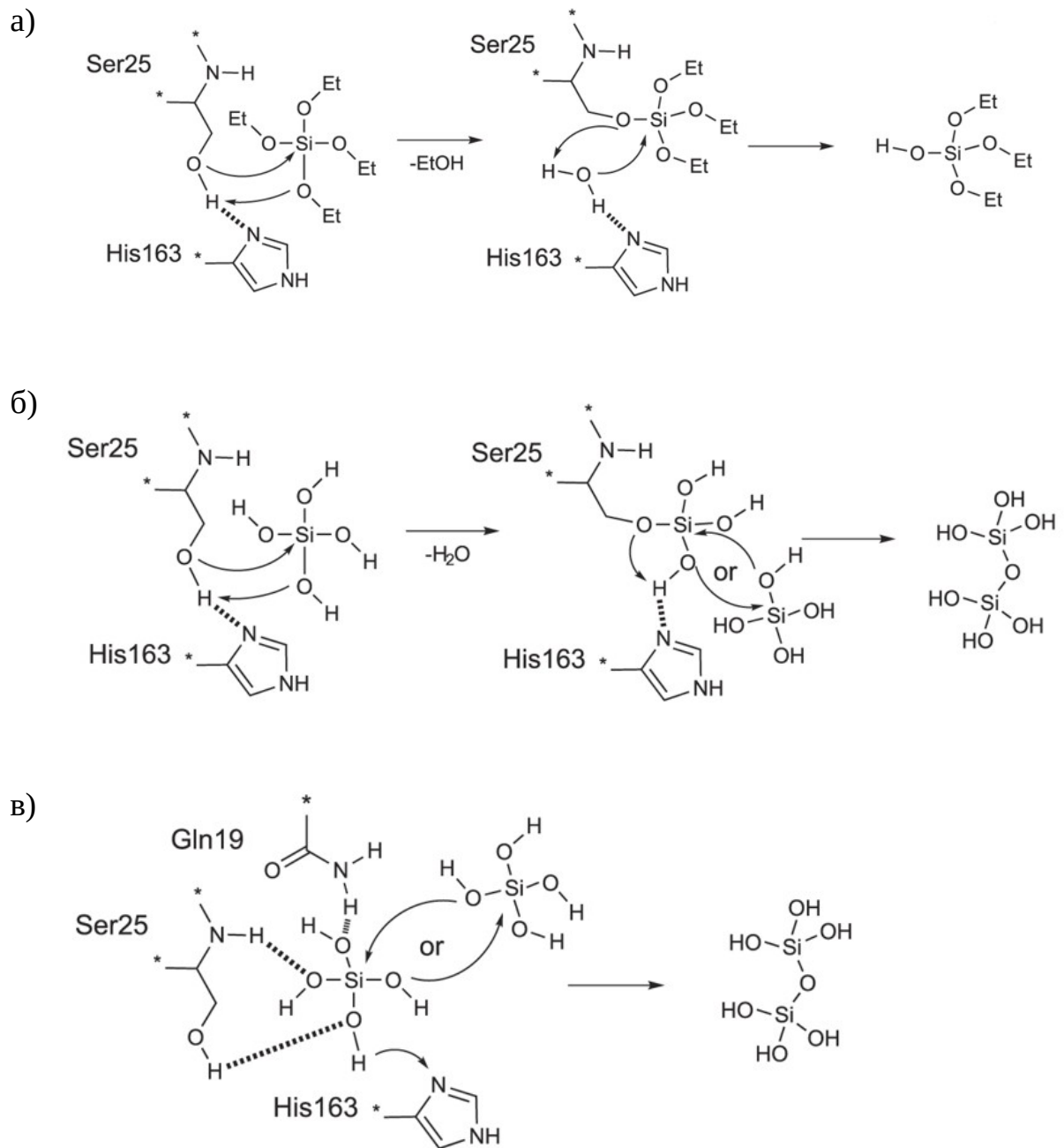


Рисунок 1.6 — Предположительный механизм начальной стадии активации молекулы ортокремневой кислоты в активном центре силикатеина- α . Где а) – механизм, предложенный (Zhou *et al.*, 1999), б) – механизм, предложенный (Schröder *et al.*, 2012) и в) – механизм, предложенный (Fairhead *et al.*, 2008)

Первый механизм (Zhou *et al.*, 1999) заключается, в нуклеофильной атаке кислорода гидроксила ТЭС на атом водорода гидроксила Ser, в то время как кислород этой группы атакует атом кремния ТЭС. Результатом является молекула

воды (протон видимо забирается из среды) и ТЭС ковалентно связан с аминокислотным остатком Ser, рисунок 1.6а.

Второй механизм (Schröder *et al.*, 2012) характеризуется тем, что модельным субстратом выступает молекула ортокремниевой кислоты, и также совершаются две нуклеофильные атаки: первая атака кислорода Ser на атом кремния ТЭС, вторая - кислорода ТЭС на водород водородной связи Ser-O-H- -N(pros)-His отличается от первого тем, происходит элиминация молекулы воды и образование ковалентной связи между Ser и силикатом, а также водородная связь между водородом соседней гидроксила молекулы ортокремниевой кислоты и депротонированным N(pros) имидазольного кольца His. Завершающий шаг: это атака кислорода гидроксила другой молекулы ортокремниевой кислоты приводит к образованию силоксановой связи и отсоединение пирофосфата от активного центра, рисунок 1.6б.

Третий механизм (Fairhead *et al.*, 2008) вовлекает в реакцию третий аминокислотный остаток активного центра силикатеина - Gln19. В качестве модельного субстрата выступает молекула ортокремниевой кислоты, которая образует 3 водородные связи с аминокислотными остатками активного центра, две из которых приходится на Ser (водород гидроксильной группы образует водородную пару с кислородом субстрата, в то время, как водород азота пептидной связи Ser образует вторую пару с соседним кислородом того же субстрата) и одна на Gln. В результате H^+ с субстрата переходит на N(pros) имидазольного кольца His, что приводит к полному его протонированию. Шаг образования пирофосфата аналогичен схеме второго механизма, рисунок 1.6в.

1.6 Роль переноса протона при ферментативном катализе

Молекулярные ионы водорода в формах H_2^+ и HD^+ , считаются простейшими молекулами в природе. Для данных систем существует точное решение уравнения Шредингера, можно рассчитать положение их в пространстве и энергию (Vera *et al.*, 2017). Перенос протона (pT) - элементарная химическая реакция, которая

играет центральную роль в ферментативном катализе и мембранном транспорте. Реакции переноса протона в биохимических реакциях часто протекает через последовательную передачу протона через молекулы воды. Grotthuss с соавторами (Miyake and Rolandi, 2016) предположил, что мигрирует сам заряд, посредством последовательного присоединения к молекулам с последующей их переориентацией. Используя силовое поле ReaxFF и DFT расчеты, J. M. Rimsza с соавторами получили распределение скоростей диффузии атомов водорода и кислорода в водном растворе и пришли к выводу, что атомы водорода диффундируют на 10-305 быстрее (Rimsza *et al.*, 2016).

В отличие от электрона, для которого в основном свойственно квантово-механическое туннелирование, протон, обладающий большей массой способен туннелировать лишь в условиях коротких донорно-акцепторных взаимодействий (Salna *et al.*, 2017). В узких и слабо полярных белковых каналах вода имеет тенденцию образовывать квазиодномерные водородно-связанные цепи, которые, как считается, обеспечивают превосходные пути протонной проводимости (Hassan and Hummer, 2006). Расстояние между исходным донором и конечным акцептором может достигать 10–30Å. Подвижность плоскости имидазольного кольца гистидина может привести к снижению энергетического барьера реакции переноса протона в пределах цепи (Kailaa and Hummera, 2011). Увеличение диэлектрической проницаемости среды приводит к увеличению энергетического барьера реакции переноса барьера в пределах цепи, за счет понижения свободной энергии реагента больше, чем энергии переходного состояния (Kaila and Hummera, 2011). Время перемещения H^+ от тау-азота имидазольного кольца до второй молекулы воды в квазиодномерной системе составила 200 фемтосекунд (Kaila and Hummera, 2011). Другими авторами, методом DFT, в базисе 6-31G* продемонстрировано, что перемещение протона происходит в течение ~ 100 фс на расстояние 14Å с положительного заряженного иона гидроксония на тN имидазола (движение проходит в полости одностенной углеродной трубки (длина 13,5Å, радиус 8Å, содержащую 144 атома углерода sp^2 без заряда) вдоль цепочки

молекул воды) (Hassan and Hummer 2006). Внешнее возмущение в пределах $\sim 0,5 - 1,0$ В/А вносит существенное изменение энергетического профиля реакции переноса H^+ (Hassan and Hummer 2006), препятствуя передаче одного H^+ вдоль цепи.

Изучая протонно-донорную-акцепторную пару имидазолия-имидазола и полусогласованные цепочки воды, установили линейную зависимость величины барьера от протонной аффинности донора, но почти не зависит от протонной аффинности акцептора. Кроме того, перемещение протона по длинной квазиодномерной цепочке воды более энергетически выгодно (Kailaa and Hummera, 2011).

Применение поли-имидазола (PVI) и поли-His, как упрощенные модельных объектов изучения помогут идентифицировать как функциональные группы, принимающие активное участие в катализе, так и выяснить роль и распределение водородных и электростатических взаимодействий (Patwardhan and Clarson, 2003). Также при наличии активности по отношению к молекулам ортокремневой кислоты могут выступать альтернативными биоподобными катализаторами в производстве.

Для свободного имидазольно кольца, PVI и для поли-His были рассчитаны pK_a на основе частичного распределения заряда. Расчеты произведены в программе Marvin, при температуре $24,85C^\circ$. Для имидазольного кольца τN $pK_a = 6,97$ и πN $pK_a = 13,4$. Для PVI для азота имидазольного кольца N_1 $pK_a = 6,79$ и для поли-His: τN $pK_a = 6,14$ и πN $pK_a = 13,1$. Полученные теоретические расчеты хорошо согласуются с данными потенциометрического титрования (Roques-Carnes *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2009)

Для проверки активности PVI и поли-His Liang M. с соавторами подготовили серию PVI, отличающихся по длине поливинилимидазола, с молекулярной массой 7 кДа, 14 кДа, 48 кДа, 106 кДа, 240 кДа, маркировка названия указывает на молекулярную массу цепочки и поли-His с молекулярной массой 39 кДа (Liang *et al.*, 2009).

Порядок конденсации молекул ортокремневых кислот: мономеры, димеры, тримеры, тетрамеры с дальнейшим образованием более крупным частиц. При добавлении молекул с имидазольным кольцом приводило к увеличению k_3 (константы третьего порядка) на ранних стадиях кинетики конденсации молекул ортокремневых кислот. Максимум для PVI-106 составил 135%, а для поли-His 143%. Увеличение константы k_3 согласуется с предыдущими исследованиями (Belton *et al.*, 2005). Авторы предполагают, что кинетическая константа k_3 описывает образование тримеров из димеров и мономеров кремниевых кислот (Liang *et al.*, 2009). Также рассчитывались константы скорости первого порядка: k_+ (образования комплекса) и k_- (распада комплекса). Так k_+ и k_- оказались снижены на 80%-90% и 65%-90% для PVI, соответственно, и на 65%-67% для поли-His. Масса осадка составила 3-4мг по сравнению с контролем, в то время как через 7 дней наблюдалось примерно 14мг осадка для всех образцов (Liang *et al.*, 2009). Сканирующая электронная микроскопия показала образование пористого материала во всех образцах, однако, для PVI и поли-His наблюдались поры с одинаковым размером. Так для поли-His площадь поверхности 283 м²/г, а объем 1,06см³/г, а для PVI площадь поверхности 350-450 м²/г, а объем 0,9- 1,2 см³/г, с диаметров в 41,7Å (Liang *et al.*, 2009).

На основе полученных данных можно сделать вывод, что наличие имидазольного кольца приводит к увеличению активности конденсации мономеров кремниевых кислот. При этом поли-His сильнее повышает активность конденсации мономеров кремниевых кислот, по сравнению с PVI различной длины. Также Liang M. с соавторами выдвигают следующие предположения: депротонированная форма азотов имидазольного кольца, за счет увеличения водородных связей между His и кремниевыми кислотами, способствует увеличению скорости конденсации кремниевых кислот, в то время как протонированная форма — приводит к увеличению осаждения, за счет преобладания электростатических взаимодействий (Liang *et al.*, 2009).

1.7 Активность и субстратная специфичность силикатеина- α

Ферментативные реакции полимеризации кремниевых кислот под действием фермента силикатеина возможны даже ниже температуры 10 °С, как у глубоководных губок (Schröder *et al.*, 2016) или у холодолюбивых губок, которые обитают в озере Байкал при температуре ~0 °С на глубине 1000м (Кондратов с соавт., 2012). Для силикатеина характерно то, что он катализирует реакцию конденсации биокремнезема при концентрациях (<1 мМ), которые ниже концентраций, необходимых для химической автополиконденсации ортокремниевой кислоты (> 1 мМ; при нейтральном рН) (Schröder *et al.*, 2016).

Cha с соавторами (Cha *et al.*, 1999), выделив в активном виде фермент, продемонстрировали, что процесс биосилификации происходит при нейтральном значении рН и нормальной температуре. Оптимум рН для рекомбинантного силикатеина находится в диапазоне 6,5-10,5, с максимумом при 10 (Dakhili *et al.*, 2017), что сопоставимо с данными, характерными для сериновых протеаз (Kirschke *et al.*, 1977). Авторы предполагают, что рН оптимум связан с депротонированностью N имидазольного кольца His, входящего в активный центр силикатеина (Craik *et al.*, 1987). Dakhili с соавторами продемонстрировали аллостерическое ингибирование силикатеина- α избыточной концентрацией субстрата в среде. Так уже при концентрации 0,06мМ для рН=6,5 и для концентрации субстрата 0,10мМ, для большего значения рН наблюдалось снижение ферментативной активности даже, несмотря на то, что 4-нитрофенол не является природным субстратом для данного фермента (Dakhili *et al.*, 2017).

Природными субстратами предположительно являются кремниевые кислоты, растворимые в воде (Weaver and Morse, 2003). Кроме этого, силикатеин способен катализировать конденсацию силоксанов: тетраэтоксиселана (Müller *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012), 4-нитрофеноксисилана (Dakhili *et al.*, 2017), триэтоксивинилсилан (Cha *et al.*, 1999) .

В водных растворах силикатеин способен депонировать на своей поверхности такие соединения как: фосфат титана, оксид титана, оксид циркония и 1-лактид (Tahir *et al.*, 2004; Tahir *et al.*, 2005; Curnow *et al.*, 2006). Wang с соавторами продемонстрировали подход образования Ca - спикул с высокой степенью эластичности (Wang *et al.*, 2012). Начиная с концентрации 5mM CaCl₂ и выделенного силикатеина-α был получен карбонат аммония ((NH₄)₂CO₃) за счет диффузии (ammonia carbonate diffusion method). Спустя 4 часа были получены "иглы" длиной 300 мкм и диаметром 10 микрометров. Модуль Юнга таких "игл" составлял 3ГПа и 20ГПа после 7 месяцев выдержки, так же с течением времени пределом прочности возрастал от 170МПа до 442МПа. Однако если использовать сильно щелочную среду (pH 11) и температуру около 80°C и в качестве начальных субстратов выбрать CaCl₂ и Ca(CO₃) в эквимольных концентрациях, равных 0,2 mM, спустя 6 часов полимеризации образуется кристаллы кальцита с базовой повторяющейся молекулярной тригональной (ромбоэдрической) сингонией (Zhao *et al.*, 2014). Размер кристаллов варьировал от 2,5мкм до 200нм. Авторами также продемонстрировано, что на скорость и размера кристаллов влияют: 1-бутил-3-метилимидазолия ([C₄mim][C₈OSO₃]) додецилсульфат и хлорид магния (MgCl₂).

Ранее было продемонстрировано, что ферментативная кинетика силикатеина может быть описана кинетикой Михаелиса-Ментена и K_m для предполагаемого природного субстрата (Smith *et al.*, 1989, Müller *et al.*, 2013). И K_m составляет 22 мкМ (Weg *et al.*, 2008), в то время как концентрация химической поликонденсации силикатов составляет 1мМ. Для модельных субстратов наблюдается следующая закономерность: самое низкое значение K_m = 7,5±2,6 мкМ соответствует взаимодействию силикатеин-α с TDS, в то время как более мелкий по размеру субстрат TBDMS имеет большее значение K_m = 76,4±47,2 мкМ. Значения k_{cat} тоже соответствовали этой тенденции и составляли: для TDS = 61,5±5,4 мин⁻¹, TBDMS = 611,1±32,0 мин⁻¹, TIPS = 166,5±89,7 мин⁻¹. Константа специфичности (k_{cat}/K_m) для TDS = 4,6±1,9 мин⁻¹*мкМ⁻¹, TBDMS = 48,3±6,0 мин⁻¹*мкМ⁻¹, TIPS = 4,7±4,0 мин⁻¹*мкМ⁻¹ также наблюдается снижение значения с увеличением размера

субстрата (данные получены на основе независимых 10 повторов) (Dakhili *et al.*, 2017).

Гидролитические протеазы и эстеразы способны проводить ферментативную реакцию в обратном направлении, через изменения значений констант образования и распада ферментативного комплекса (Gais *et al.*, 2001). На основе сходства силикатеина- α с катепсином L была сформулирована гипотеза о наличии эстеразной активности силикатеина- α . В работе Gais H. J. с соавторами, в качестве субстрата выступала молекула 4-нитрофенол, в которой диметилсилоксигруппа замещена на эфир или амид (Gais *et al.*, 2001). Силикатеин- α и мутантный силикатеин не показали эстеразную активность. При исследовании протеазной активности с использованием модельного дипептида, также активность не проявлялась, контролями выступали ферменты: катепсин L и химотрипсин (Dakhili *et al.*, 2017). Хотя химотрипсин и катепсин L обладают низкой гидролитической активностью по отношению к TBDMS (Tanizawa *et al.*, 1991).

Для изучения этой активности у силикатеинов были задействованы в качестве субстратов 1-октанол (OcOH) с триметилсиланом (TMS-OH) с получением на выходе силилового эфира (TMS-Ooc). В результате через 72 часа наблюдалась 20% конверсия (Dakhili *et al.*, 2017). Dakhili с соавторами продемонстрировали, что при температуре 75 °C лиофилизированный силикатеин- α обладает максимальной скоростью конверсии конденсации ортокремниевой кислоты (Dakhili *et al.*, 2017). Такие результаты соответствуют предыдущим исследованиям, что неполярные органические растворители улучшают стабильность фермента (Stepankova *et al.*, 2013). Также авторы отмечают крайне низкий выход продуктов (меньше 0,5% через 24 часа, по сравнению с 17% выходом у лиофилизированного фермента) при смешивании раствора OcOH, TMS-OH с малыми молекулами (фрагментами активного центра силикатеина- α), такими как: имидазол, гистидин, триэтиламин (Dakhili *et al.*, 2017). В результате можно отметить, что самостоятельные отдельные молекулы активного центра не

приводят к существенному увеличению скорости протекания данной химической реакции.

1.8 Конденсация и олигомеризация природных субстратов силикатеина- α в водной среде

Природными субстратами для силикатеина- α являются кремниевые кислоты, растворимые в воде (Weaver and Morse, 2003; Sparkes *et al.*, 2020). Кремниевые кислоты имеют общую формулу $n\text{SiO}_2 \cdot m\text{H}_2\text{O}$. Если в составе больше одного атома кремния, такие кислоты получили название — поликремниевые кислоты, соединенные прочными ковалентными связями в качестве мономера выступает (SiO_4) . Атом кремния тетраэдрически окружен четырьмя атомами кислорода, через которые возможно присоединение другого тетраэдра. В результате взаимной ориентации тетраэдров через образование силоксановых связей (Si-O-Si) образуются различные модификации кремнезема. Связь Si-O ковалентно-ионная связь с преобладанием ковалентной связи. В свободном состоянии выделены: ортокремниевая кислота H_4SiO_4 , метакремниевая кислота (H_2SiO_3) и другие кислоты.

Ортокремниевая кислота растворима в воде и достаточно долгое время стабильна при температуре в диапазоне от 4°C до 40°C (Belton *et al.*, 2012) вплоть до концентрации, порядка 100ppm (≈ 1 mM). Поскольку pK_a $\text{Si}(\text{OH})_4$ составляет 9,8, то при нейтральном pH 0,18% будет находиться в ионизированной форме. В диапазоне pH 6,5 до 10,5 наблюдается рост олигомеров, без их агрегации.

Реакция конденсации двух молекул ортокремневых кислот является фундаментальным, элементарным шагом олигомеризации кремниевых кислот и химии кремний содержащих соединений. Понимание процесса зарождения и рост олигомеров несет фундаментальное и технологические значение. Общую схему конденсации кремниевых кислот можно представить, как серию последовательных этапов (Brinker *et al.*, 1988, Moqadam *et al.*, 2015).

На первом этапе происходит гидролиз молекулы кремний содержащего субстрата, за счет нуклеофильной атаки атома кислорода H_2O на кремний, о чем свидетельствуют результаты реакции с меченной H_2O и ТЭОС в качестве субстрата (Khaskin, 1985), которая протекает как в кислых, так и в щелочных условиях:



Следующий этап — это конденсация не активированной кремний содержащей молекулы с гидроксильной группой продукта предыдущей реакции:



Конденсация возможна между двумя образовавшимися гидроксилами кремниевых кислот, с выделением одной молекулы воды:



Из уравнений 1-3, можно сделать вывод, что реакции в золь-гель процессе состоят из последовательных реакций гидролиза и конденсации, с возможностью обратного процесса гидроксильной или гидролитической деполимеризации и реакции этерификации. ТЭОС, органодиалкоксисиланы, диорганодиалкоксисиланы способны к гидролизу с участием молекул воды (Brinker *et al.*, 1988).

В присутствии спиртов, ацетона, диоксана, тетрагидрофурана и др. происходит увеличение скорости гидролиза. Кроме органических растворителей увеличивать скорость реакции возможно с использованием NH_3 , CH_3COOH , KOH , аминов, KF , HF , алкоксидов Ti , оксидов Va . Растворение кремневых кислот в фосфатных и цитратных буферных системах приводит к увеличению агрегации и выпадению нерастворимого осадка (Annenkov and Danilovtseva, 2017). Изменяя концентрацию растворителей, можно сдвигать реакции 1 и 3 или к образованию продуктов или к образованию исходных субстратов. Так простые полиэтиленгликоли оказывают стабилизирующее действие на исходные субстраты, через образование многочисленных водородных связей (Preari *et al.*,

2014). Так же некоторые амидные растворители приводят к снижению реакции полимеризации кремниевых кислот (Igarashi *et al.*, 2017).

Реакция конденсации молекул ортокремневых кислот широко изучается с помощью различных типов спектроскопий. Изомерное разнообразие кремниевых кислот экспериментально было получено с использованием ядерного магнитного резонанса (ЯМР ^{29}Si), лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния, ИК-Фурье спектроскопии, малоуглового рассеяния рентгеновского излучения, масс-спектропии электронной ионизации с использованием газовой хроматографии и других методов (Kelts, 1989; Cho *et al.*, 2006; Halasz *et al.*, 2011; Warring and Beattie 2016). Рядом авторов отмечается, что природное содержание изотопа ^{29}Si составляет примерно 4,7%, что не позволяет отследить внутримолекулярные перестройки и межмолекулярные взаимодействия как исходных субстратов, так и получаемых продуктов концентрациях (Wijnen *et al.*, 1994). Поэтому вычислительные эксперименты позволяют дополнить данные, полученные в лаборатории.

Геохимические макромодели позволяют, в определенной степени, прогнозировать видообразование и размер образующихся олигомеров в растворе до 1200°C и до 6ГПа (Pilgrim *et al.*, 2018).

Первые химические синтезы силикагелей были проведены еще в 1844 году Эбельменом (Ebelmen *et al.*, 1846). Однако до настоящих дней химия силикатов остается востребованной отраслью производства и изучения (Mohammadian *et al.*, 2018, Rücker and Kümmerer, 2015; Jafari *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2019). В последнее время продемонстрировано, что, контролируя параметры процесса конденсации - молярное соотношение $\text{H}_2\text{O}/\text{Si}/\text{катализаторов}$, можно получить широкий спектр соединений. К примеру, Sakka с соавторами продемонстрировал олигомеризацию ТЭОС с значениями радикалов 1-2 и 0,01М HCl , приводящую к продуктам реакции с разной степенью вязкости (Sakka *et al.*, 1982). Олигомеризация ТЭОС со значениями радикалов от 7 до 25 в присутствии аммиака NH_3 с концентрацией от 1М до 7М приводит к образованию онодисперсных сферических частиц (Stober *et*

al., 1968). Brinker C.J. с коллегами продемонстрировали изменение структуры золь-зеля, в зависимости от условий конденсации и гидролиза мономеров (Brinker *et al.*, 1988). Так двух стадийная методика приводит к образованию разветвленных или слабо разветвленных структур. Методика состоит в проведении процесса олигомеризации в кислых условиях, при соотношении $H_2O:Si$, как 1:1, после 90 минутной экспозиции с добавлением четырехкратного объема H_2O , с шероховатыми частицами. В случае протекания реакций в щелочных условиях, возможно получить гладкие коллоидные частицы.

Общую схему полимеризации кремниевых кислот можно представить, как серию последовательных этапов (рисунок 1.7). Изначально формируются небольшие олигомеры, диаметр которых составляет примерно 1нм. Отмечено, что pK_a внутренних силанольных групп составляет 9,5-10,7, в то время как на периферии значение опускается до 6,8. В результате происходит образование суммарного отрицательного заряда на поверхности, что приводит к электростатическому отталкиванию. Преодоление это барьера возможно путем добавления в среду солей (к примеру, $NaCl$ или Na_2SO_4), конечная концентрация которых 0,2 - 0,3Н (нормальность). Отрицательный заряд может способствовать лучшей агрегации с положительно заряженными структурными филаментами (силикатин, силинтафин — 1, силафин — 2, муцины, глассин и др.) в процессе биоконденсации силикатов (Belton *et al.*, 2012). При увеличении доли кремниевой кислоты в водных растворах начинается спонтанная полимеризация (Dakhili *et al.*, 2017). Также следует отметить, что скорость нуклеации кремниевой кислоты в водном растворе, зависит от пересыщения C_s , C_e и pH среды (Потапов с соавт., 2019).

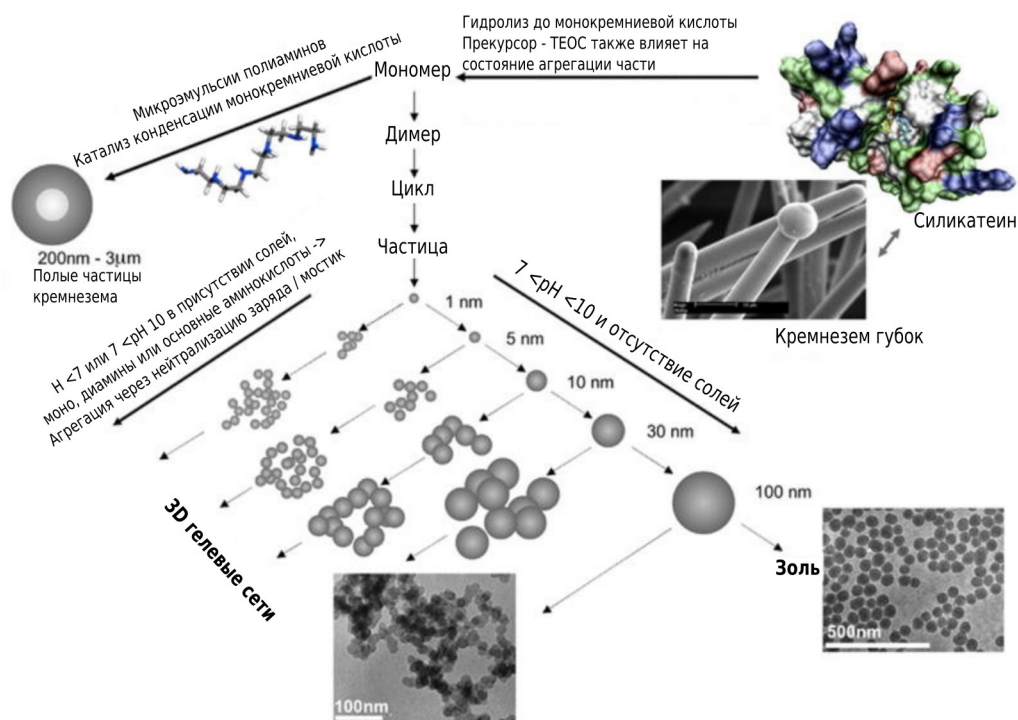


Рисунок 1.7 — Схема конденсации кремниевых кислот и рост силикатных частиц (Dakhili *et al.*, 2017)

Следующий шаг заключается в агрегации разросшихся олигомеров. И образования пористых структур. В более кислой или щелочной среде, с образованием аморфного пористого, твердого продукта — силикагеля. Пористость силикагеля зависит от начальной концентрации кремниевых кислот в растворе, позволяющей получить поры диаметром до 4 нм- мелкие; 6-10 нм средние, больше 10 нм крупные. В составе силикагеля присутствуют следующие связи: силоксановые, силанольные, адсорбированная молекула воды с водородом силанольной группы. Силанольные группы, свободно расположены в гелях с большими порами (4- 5 групп на 10 нм).

Растворимость кремнезема в воде при температуре 25°C низкая, для кварца 7 мг/л, кристоболит 12 мг/л, тридимит -16 мг/л, и кварцевое стекло 83 мг/л, что используется как качественная реакция для определения силикат-ионов. Кремниевую кислоту нельзя получить в чистом виде, поскольку в водных растворах образуется короткоживущий коллоидный раствор (золь), который

коагулируя переходит в гель. Такая форма силикатов может быть использоваться в качестве осушителей и сорбентов.

Использование разной концентрации NaOH приводит к получению цеолита разной кристаллической структуры. Кроме того, отмечено, что NaOH снижает олигомеризацию кремниевых кислот для небольших молекул (Pavlova *et al.*, 2013). Присутствие NaOH приводит к уменьшению водородных связей вокруг кремниевых кислот и увеличения энергетического барьера реакции конденсации. Как отмечают ранее проведенные исследования, такой же эффект наблюдается в присутствии других катионов (ионы Li^+ или NH_4^+) (Trinh *et al.*, 2009). В других исследованиях отмечается, что катионы Li^+ , K^+ , и Ca^{2+} и органические молекулы такие как TPA^+ , TMA^+ или TEA^+ выступают в роли структурообразующих агентов (Zhang *et al.*, 2011). Растворы гидроксидов Na^+ , TMA^+ и TBA^+ не приводят к силикалиту-1, тогда как образования TPA^+ избирательно генерируют каркасный тип MFI силикалита-1 (Trinh *et al.*, 2009). Увеличению числа и размеров олигомеров способствует использование полиаминов, при $\text{pH} = 7$ с увеличением вероятности выпадения их в осадок (Annenkov and Danilovtseva, 2017).

1.9 Олигомерное разнообразие кремниевых кислот в водном растворе.

Методы идентификации

Реакция конденсации молекул ортокремневых кислот широко изучается с помощью различных типов спектроскопий. Изомерное разнообразие кремниевых кислот экспериментально было получено с использованием методов ядерного магнитного резонанса (ЯМР ^{29}Si), лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния, ИК-Фурье спектроскопии, малоуглового рассеяния рентгеновского излучения, масс-спектроскопии электронной ионизации с использованием газовой хроматографии и других методов (Cho *et al.*, 2006; Halasz *et al.*, 2011; Ким с соавт., 2020). Рядом авторов отмечается, что природное содержание изотопа ^{29}Si составляет примерно 4,7%, что не позволяет отследить внутримолекулярные перестройки и межмолекулярные взаимодействия как исходных субстратов, так и

получаемых продуктов концентрациях (Wijnen *et al.*, 1994). Поэтому вычислительные эксперименты позволяют дополнить данные, полученные в лаборатории.

1.9.1 Эмпирические методы

^{19}Si ЯМР-спектроскопия является одним из наиболее надежных методов идентификации олигомеров кремниевых кислот. По данным ^{29}Si ЯМР спектроскопии в водном растворе при нормальном давлении доминируют следующие виды кремниевых кислот: линейный, разветвленные и циклические структуры. В кремниевых растворах идентифицировано небольшое число кремниевых олигомеров с количеством атомов Si ($n=3-9$) (рисунок 1.2). В работах (Sjöberg *et al.*, 1996) и (Harris and Knight, 1983) удалось идентифицировать 16 и 18 различных видов олигомеров. Наибольшее разнообразие олигомеров методом ^{29}Si ЯМР с применением COSY анализа удалось получить в работах Cho H. (Cho *et al.*, 2006) и Knight, Bales (Knight *et al.*, 2007) 48 видов, количество которых достигло 52 (Butler *et al.*, 2012). В работе (Vorba *et al.*, 2017) отмечены вновь идентифицированные структуры. Из всех работ идентифицированные олигомеры суммированы (75 вариантов) и представлены в графовой форме (рисунок 1.8).

Одним из бурно обсуждаемых олигомеров, определенных методом ^{19}Si ЯМР-спектроскопии является кубический октамер (Q^3_8), представленный на рисунке 1.8 под номером 8D (Nilsson *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2019). Показано, что рост Q^3_8 сопровождается снижением подвижности воды, одним из критериев которого является пониженная температура (15 °C). При этом, помимо Q^3_8 олигомера в растворе, в растворе, в меньшей концентрации присутствует Q^3_6 форма (рисунок 1.8 — призматический гексамер).

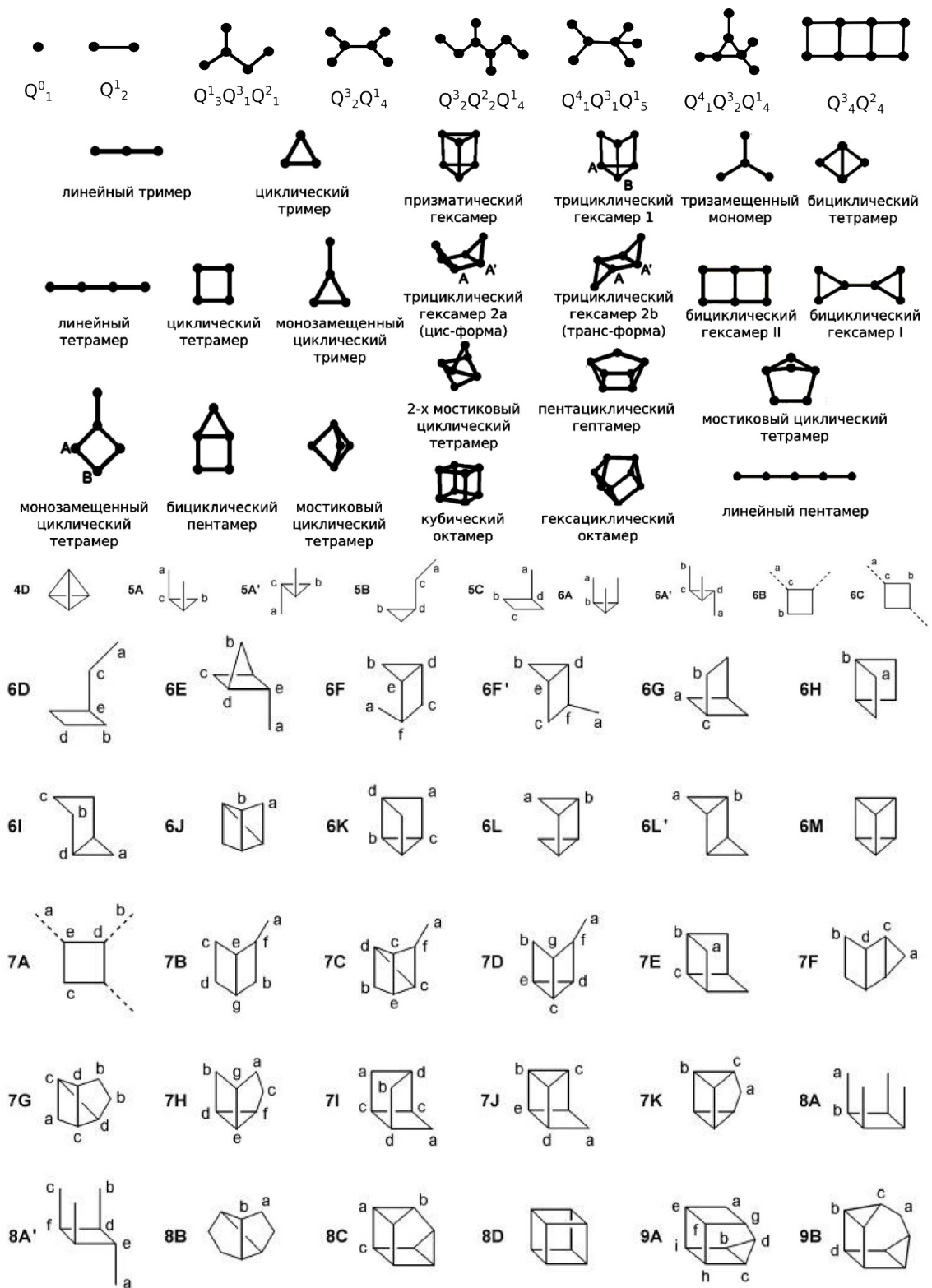


Рисунок 1.8 — Графы олигомеров кремниевых кислот, идентифицированных в растворе, на основе ^{29}Si ЯМР спектров. Количество атомов Si ($n=1-9$), где шары (узлы) - атомы кремния, палочки — силоксановая связь (Sjöberg *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 2006; Knight *et al.*, 2007; Butler *et al.*, 2012; Borba *et al.*, 2017)

Стоит отметить работу Pilgrim C.D., в которой методом ^{19}Si ЯМР-спектроскопии изучался характер олигомеризации кремневых кислот в насыщенном щелочном (NaOH) растворе с постепенным повышением давления до 1,8 ГПа. Авторы отмечают, что при нормальном давлении доминирующими видами олигомеров являются: мономер (Q^0), димер (Q^1_2), циклический тример (Q^2_3), циклический тетрамер (Q^2_4) и призматический гексамер (Q^3_6). С повышением давления до 0,9 ГПа наблюдается снижение количества Q^2_4 и Q^3_6 до полного исчезновения, однако снижение давления приводит к возвращению системы в первоначальное положение (Pilgrim *et al.*, 2018).

Полученные данные не согласуются с другими экспериментами, в которых наблюдается преобладание линейного тримера, и других небольших разветвленных олигомеров (Zerda *et al.*, 1986; Lazaro *et al.*, 2017). Однако увеличение циклических, плоских и объемных олигомеров наблюдается при добавлении в водный раствор катионов, таких как тетраалкиламмония (ТАА) и тетраметиламмония (ТМА) (Kinrade *et al.*, 1998).

В отличие от щелочных сред, в которых изучался характер и полимеризации кремневых кислот, литература по видообразованию кремнезема в кислотных условиях более ограничена. Характер распределения высокочастотных олигомеров и пути их образования крайне разнятся в литературных источниках. Некоторые авторы придерживаются модели линейного роста цепочки и их ветвлений (Depla *et al.*, 2011; Halasz *et al.*, 2011), в то время как другие отмечают образование высокого количества циклических структур. В кислых условиях (H_2SO_4 , HCl разной молярности) с помощью ЯМР ^{29}Si и УФ-комбинационного рассеяния авторам удалось провести контролируемые измерения структуры кремневого раствора (начальная молекула ТЕОС) и построить постепенное удлинение цепочек. Примечательно, что как фиксируют сами авторы: «никаких признаков присутствия 3- или 4-колец не наблюдалось». На начальном этапе наблюдались линейные формы, содержащие 1-4 атомов Si. Повышение концентрации OH — групп, привело к появлению циклических тетрамеров и

небольшого количества циклических пентамеров и гексамеров, однако циклические тримеры фиксировались, только на начальном этапе смешивания раствора и после не наблюдались, даже при экспозиции раствора 140 часов.

Динамика изменения количества олигомеров со временем, полученная ЯМР ^{29}Si спектроскопией и спектроскопией УФ-комбинационного рассеяния, показала, что на первом этапе концентрация мономеров, снижается в пользу димеров, а на следующем этапе наблюдается медленное снижение мономеров, постоянное количество димеров и рост олигомеров с более длинной цепью (рисунок 1.9).

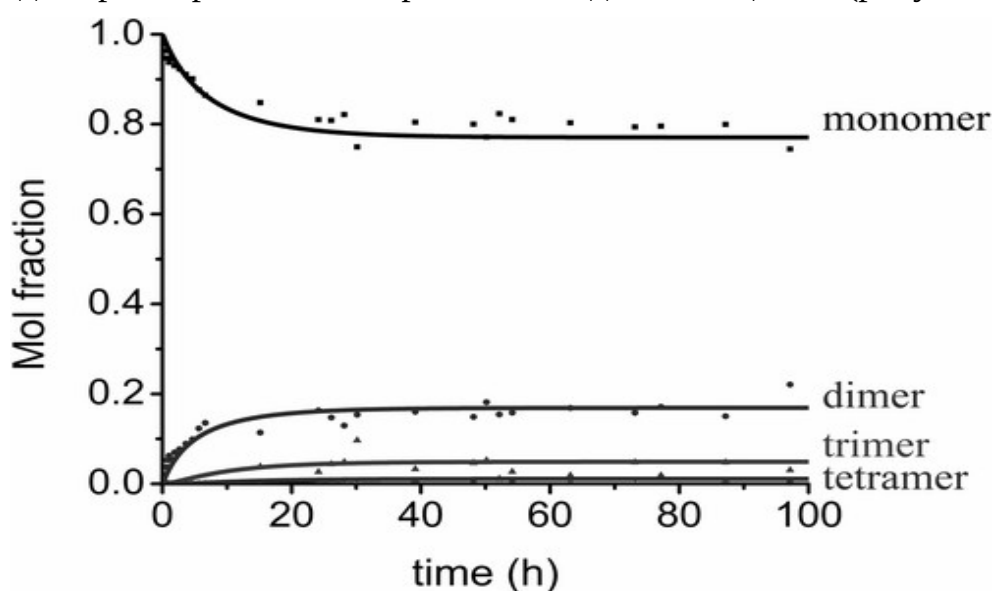


Рисунок 1.9 — Эволюция молярных соотношений олигомеров в течение 100 часов экспозиции, полученная методами ЯМР ^{29}Si спектроскопией и спектроскопией УФ-комбинационного рассеяния для соотношения

$\text{TEOS}:\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{SO}_4(1:0,2:3,08:0,35)$ (Depla *et al.*, 2011)

По результатам проведенного исследования ЯМР ^{29}Si , с последующим построением кинетической модели авторы отметили, что образование димера происходит в 2,6 раз медленнее, чем увеличение цепочки до тримера (Depla *et al.*, 2011, Trinh *et al.*, 2009). Также важно заметить, что наблюдается отрицательная корреляция между концентрацией воды и константами скорости образования олигомеров, но не разнообразием образующихся олигомеров. При этом положительную корреляцию отметили при увеличении температуры и мощности используемого лазера (с 10 мВт на 30 мВт) при проведении ^{29}Si ЯМР

спектроскопии. Авторы так же отметили, что на характер циклизации, как отмечалось выше, влияет наличие алкоксида (Depla *et al.*, 2011).

1.9.2 Теоретические расчеты

По мере увеличения количества атомов кремния, увеличивается число изомеров, что приводит к усложнению идентификации конкретной структуры. На сегодняшний день вычислительная химия из области высоко-теоретической постепенно перешла в раздел экспериментальной, лабораторной химии, которая активно дополняет, а иногда и предопределяет экспериментальные исследования. Высокопроизводительные вычисления, умные алгоритмические подходы и информационные технологии внесли существенный вклад в развитие методов разработки.

Для определения требуемых параметров используются вычисления, базирующиеся на методах классической механики (Cowenab *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020), а так же квантово-химические расчеты (Pereira *et al.*, 1998; Cuko *et al.*, 2017; Srivastava *et al.*, 2018), с различным уровнем сложности используемых различных функционалов и базисов. В результате чего активно развиваются и используются *ab initio* вычисления химических ^{19}Si ЯМР спектров (Butler *et al.*, 2012, Sun *et al.*, 2020). Однако, DFT МД проводятся на небольших системах, размером $(10,953 \times 10,953 \times 10,953 \text{ \AA})$, с протяженностью 10 пс.

Кроме того, возможно использование гибридных систем (Marx *et al.*, 2000), где часть системы рассчитывается с использованием молекулярной механики, а другая часть с использованием уравнений квантовой химии. Расчеты могут быть выполнены как в вакууме, в газовой фазе так и с использованием модели поляризованного континуума (PCM) (Miertuš *et al.*, 1981), а также в присутствии явного растворителя.

Методы квантовой химии

Одной из классических работ описывающих геометрию кремневой кислоты является работа Galeener F. L. 1982 года, в которой продемонстрировано, что угол

$\angle O - Si - O$ в плоских кольцах составляет $= 109,5^\circ$ (Galeener *et al.*, 1982). Ранее в работе R. L. Mozzi and B. E. Warren отмечено, что угол $\angle Si-O-Si$ в аморфном кремнеземе колеблется в диапазоне 120° до 180° с максимумом при 144° (Mozzi and Warren, 1969).

Расчеты, выполненные в программном пакете Gaussian 09 с использованием DFT с функционалом B3LYP RHF/6-311G (d), демонстрируют, оптимальное значение угла $\angle Si-O-Si$ в диапазоне от 120° до 180° (Srivastava *et al.*, 2018). В то время, как методом дифракции рентгеновских лучей (XRD) для плоских колец с количеством Si = 3, 4, 5 было показано, что величина угла $\angle Si-O-Si$ составляет около $130,5^\circ$, $160,5^\circ$ и $178,5^\circ$ соответственно. Отмечено, что для аморфного кремнезема расстояние Si-O составляет $r = 1,62 \text{ \AA}$. Пик угла $\angle Si-O-Si$ в аморфном кремнеземе приходится на $146,08^\circ$, а для угла $\angle O-Si-O$ $107,03^\circ$ с учетом использования в расчетах банка данных PDF (Powder Diffraction File). При использовании метода Ритвельда пик угла $\angle Si-O-Si$ в аморфном кремнеземе составляет 142° , а для угла $\angle O-Si-O$ $109,8^\circ$ (Srivastava *et al.*, 2018). По DFT расчетам Tielens F. с соавторами энергетический барьер вращения силоксановой связи, вдоль угла $\angle Si-O-Si$ составляет около 4 кДж/моль (Tielens *et al.*, 2001).

Эксперименты по рассеянию PDF проводили на кварце и аморфном кремнеземе. В аморфном кремнеземе практически все атомы Si были тетраэдрически связаны с четырьмя атомами O, тогда как все атомы O были связаны с двумя атомами Si. Было зарегистрировано 2 пика: 1-й пик при $r = 1,62 \text{ \AA}$, взаимодействие атомов Si-O, 2-й пик при $r = 2,71 \text{ \AA}$, взаимодействие атомов O - O (Biswas *et al.*, 2018). Угол связи $\angle Si-O-Si$ для аморфного кремнезема составлял около $146,08^\circ$, а величина угла $\angle O-Si-O$ составляла $107,03^\circ$ (Biswas *et al.*, 2018).

Валентный угол связи $\angle Si-O-Si$ в плоских силикатных кольцах с Si $n = 3, 4, 5$ составил около $130,5^\circ$, $160,5^\circ$ и $178,5^\circ$, соответственно (Biswas *et al.*, 2018).

Аналогично в кварце каждый атом Si был тетраэдрически окружен четырьмя атомами O с двум пиками: 1-й $r = 1,56 \text{ \AA}$ взаимодействие атомов Si — O,

2-й пик при $r = 2,66 \text{ \AA}$, взаимодействие атомов O - O. Валентные углы $\angle \text{Si-O-Si}$ и $\angle \text{O-Si-O}$ для кварца составили около $146,78^\circ$ и $107,905^\circ$ (Biswas *et al.*, 2018).

Одна из первых вычислительных работ изучения конденсации молекул ортокремневых кислот в растворе является работа Pereira J.C. с соавторами (Pereira *et al.*, 1998). Для расчетов использовался программный пакет COSMO (Trinh *et al.*, 2006), расчеты проводились с учетом растворителя, при $\text{pH} < 3$. В качестве растворителя имитируя, химическое производство, использовалась смесь вода:алкоксид (в соотношении 2:4) и метанол:алкоксид (в соотношении 4:10) (Pereira *et al.*, 1998), рисунок 1.10.

Общая схема конденсации двух молекул ортокремниевой кислоты выглядит следующим образом: $2\text{Si}(\text{OH})_4 \rightarrow \text{Si}_2\text{O}(\text{OH})_6 + \text{H}_2\text{O}$

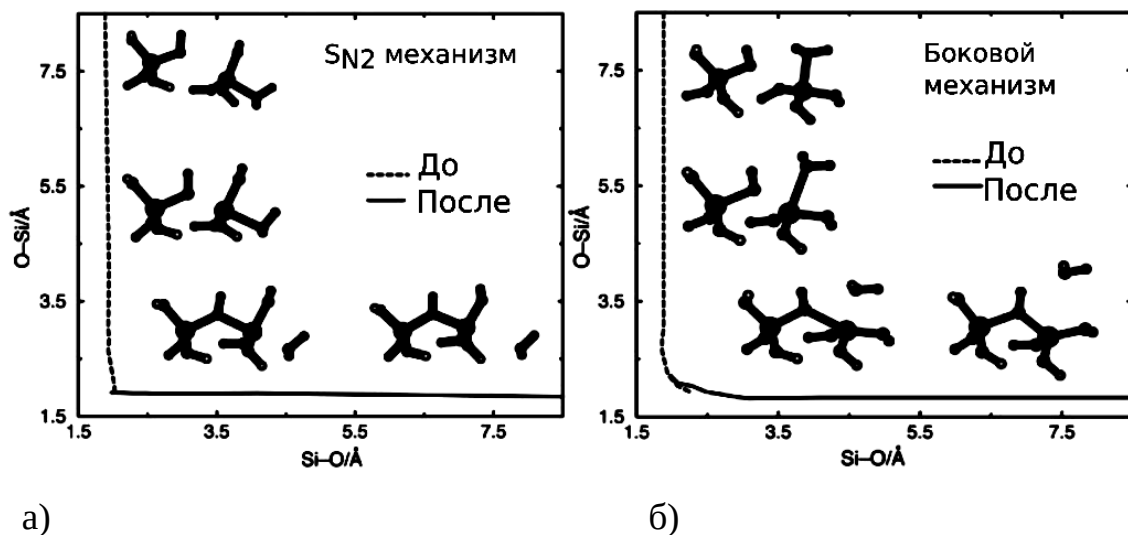


Рисунок 1.10 — Поэтапный механизм реакции конденсации $\text{Si}(\text{OH})_4$ и $\text{Si}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})^+$: а) - $\text{S}_{\text{N}2}$ механизм и б) - боковой механизм. Где ось y — расстояние в Å между «O» атакующего мономера и «Si» протонированного мономера, а ось x — расстояние в Å между «Si» протонированного мономера и «O» удаляющейся молекулы воды (Pereira *et al.*, 1998)

Первой стадией реакции конденсации ортокремневых кислот в кислой среде, является образование протонированной формы молекулы $\text{Si}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})^+$. Реакция в газовой фазе проходит с выделением энергии (экзотермическая) $\Delta E = -18,8$

ккал/Моль, однако в метанольной среде реакция становится эндотермическая $\Delta E = 7,4$ ккал/Моль (Pereira *et al.*, 1998): $\text{Si}(\text{OH})_4 + \text{H}_3\text{O}^+ \Delta E \rightarrow \text{Si}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})^+ + \text{H}_2\text{O}$

Следующая стадия реакции - это конденсация активированной формы ортокремниевой кислоты с нейтральной молекулой. Реакция в газовой фазе проходит с высвобождением энергии (экзотермическая) $\Delta E = -6,8$ ккал/Моль, однако в метанольной среде реакция также протекает с затратой энергии $\Delta E = 5,1$ ккал/Моль (Pereira *et al.*, 1998): $\text{Si}(\text{OH})_4 + \text{Si}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})^+ + \Delta E \rightarrow \text{Si}_2\text{OH}(\text{OH})_6^+ + \text{H}_2\text{O}$.

На основании квантово-химических расчетов рядом авторов продемонстрировано, что анионный путь, более энергетически выигрышный, следовательно и более вероятный, чем нейтральный. Энергетический барьер образования димеров и тримеров, составляет порядка 80 кДж/моль, и значительно превышает энергетический барьер для образования последующих олигомеров. Энергетический барьер для циклических олигомеров еще выше и составляет около 100 кДж/моль (Pereira *et al.*, 1998; Tossell *et al.*, 2005; Trinh *et al.*, 2006; Criscenti *et al.*, 2006). Предположительно полимеризация молекул ортокремниевой кислоты идет по нуклеофильному механизму.

Методы молекулярной механики

В механизме конденсации молекул ортокремниевой кислоты важное значение получает взаимодействие кремниевых кислот с молекулами воды. Одним из методов изучения механизмов реакции является *ab initio* вычисления. Однако методы квантовой химии не могут быть применены к большим кластерам, содержащим молекулы воды и кремниевые кислоты. Для расчета больших кластеров используются методы, обладающие меньшими вычислениями исследуемой системы, что ведет за собой упрощение представления описываемой системы. Для моделирования поведения больших систем используются методы молекулярной механики. Широкое распространение получили методы молекулярной динамики, не приводящие к разрыву и образованию связей. Однако, для изучения процесса конденсации, требуется силовое поле с возможностью

динамически разрывать и образовывать ковалентные связи, с потенциалом, способным описывать внутри- и межмолекулярные взаимодействия.

В лабораторных условиях время полимеризации кремниевых кислот в водном растворе определяется диапазоном от нескольких секунд до часов (Rao and Gelb, 2004). В то время как скорость олигомеризации в ходе молекулярной динамики на сегодняшний момент ограничена наноразмерным диапазоном. Для увеличения времени молекулярной динамики система обычно нагревается от 500 до 1500-2000K (Feuston and Garofalini, 1990, Rao and Gelb, 2004, Rimsza *et al.*, 2018). Авторы наблюдали сходный рисунок образования димеров в независимости от установленной температуры. Образование димеров складывается из нескольких шагов: образование ионизованных мономеров, взаимодействие их через формирование пяти координированного атома кремния с последующей диссоциацией кислорода или гидроксила (образование молекулы H₂O) по S_{N2} типу. Потенциал, предложенный Feuston и Garofalini, демонстрирует адекватное описание мономеров и олигомеров в водных условиях, за счет депротонации (Feuston and Garofalini, 1990): $\text{H}_4\text{SiO}_4 \rightarrow \text{H}_3\text{SiO}_4^- + \text{H}^+$. В дополнении, в ходе динамики осуществляется небольшая корректировка двугранного угла, образованных комбинацией: $\angle \text{Si-O-Si}$, $\angle \text{O-Si-O}$ и $\angle \text{Si-O-H}$, а также угла $\angle \text{H-O-H}$ молекулы воды. Особенность трехтельного потенциала не позволяет использовать кислород разных видов, что не позволяет моделировать системы, состоящие из нескольких фазовых состояний силиката и включать дополнительные, атомы (Ca, Br, Al, Au и других (Plimpton *et al.*, 1995, Rimsza and Du, 2018). Кроме того, потенциал не содержит условий для переноса заряда и поляризуемости (Rao and Gelb, 2004).

Несмотря на ограниченность применения реакционного силового поля Feuston и Garofalini, базирующегося на данных квантово-химических расчетов и данных рентгеновской и нейтронной дифракции (Soper *et al.*, 1982), данный потенциал хорошо описывает H₂O-H₂O взаимодействие, допускает диссоциацию молекулы воды, описывает включение кислорода или гидроксида в силикатную

структуру, что говорит о том, что кислородный атом хорошо обрабатывается как подсистемами взаимодействия молекул воды, так и кремниевых кислот. Авторы отмечают, что при моделировании больших водно-силикатных кластеров, отмечается хорошая согласованность распределения углов и длин связей с экспериментальными данными (Приложение А, таблица 1), при этом наблюдается наличие дефектов связей меньше 2%, что в целом сопоставимо с наблюдаемыми данными в лабораторных испытаниях (Newel *et al.*, 1989).

Общий потенциал складывается из двух-тельного потенциала — модификация потенциала Born-Mayer-Huggins (BMH) и трех-тельного потенциала — взаимодействия трех тел, представляющего обобщенного потенциала Stillinger и Weber (Stillinger and Weber, 1985), введенный для корректировки углов (Feuston and Garofalini, 1990). Порог обрезания для электростатических взаимодействий приходится на $5,5\text{\AA}$. Тестовая система, изучающая олигомеризацию кремниевых кислот построена из 27 равноудаленных мономеров, расположенных матрицей $3*3*3$, в ячейки периодичности, авторам удалось провести лишь короткую динамику, при пошаговом возрастании температуры на 500К от 500К до 2500К. После повышения температуры до 2500К, проводилась динамика длительностью в 20пс. В результате 50% мономеров олигомеризовались, самый большой был представлен разветвленным гексамером (Feuston and Garofalini, 1990).

Rao и Gelb, используя силовое поле, разработанное Feuston и Garofalini (Feuston and Garofalini, 1990) провели широкомасштабное моделирование (более 30000 атомов) при различной концентрации кремниевых кислот и температуре от 1500-2500К в течение от 1,6нс до 12,5нс. Отмечено, что при температуре 1200К результаты согласуются с экспериментальными скоростями с точностью до одного порядка (Rao and Gelb, 2004). Траекторию в 12,5нс, содержащую 729 мономеров ортокремневой кислоты, авторы разделяют на следующие этапы: образование небольших олигомеров, на интервале первых 5нс (рисунок 1.11), образование "компактных" и "некомпактных" кластеров, и кластер-кластерная агрегация на 11нс. Средний размер кластера растет на протяжении всего моделирования.

Следует отметить, что наиболее часто встречаемый олигомер - это димер, который присутствует в системе даже на поздних этапах образования крупных кластеров (Rao and Gelb, 2004). Это согласуется с данными ЯМР анализа и предположительно является стартовым субстратом образования циклического тримера (Knight *et al.*, 1989). Энергия активации конденсации мономеров оценивается в 13-15 ккал/моль, что согласуется с экспериментальными значениями (Rao and Gelb, 2004).

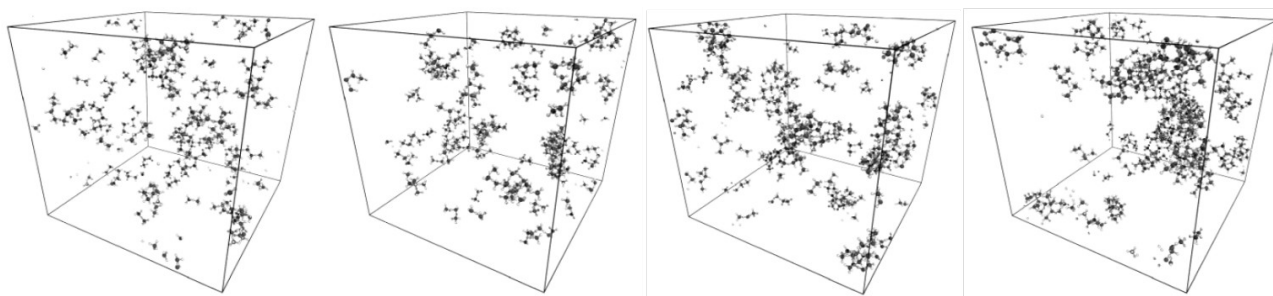


Рисунок 1.11 – Снимки состояния системы в ходе МД на 1нс (а), 2нс (б), 3нс (в), 4,8нс (д). Для наглядности убраны молекулы воды и атомы водорода. Темным цветом – атом Si, светлым – атом O (Rao and Gelb, 2004)

В основе многих современных исследования олигомеризации силикатов лежит классическое реакционное поле ReaxFF (Huff *et al.*, 1999) и производное от него ReaxFFSiO (Duin *et al.*, 2003), реализованное с использованием открытого кода классической молекулярной динамики LAMMPS, разработанного Sania National Laboratories (Plimpton *et al.*, 1995). Отличительной особенностью силового поля ReaxFF, разработанного Ersan Demiralp с соавторами, заключается в способности изменения парциальных зарядов на атомах, изучаемой модели, в зависимости от окружения, в ходе проведения расчетов. Кроме того, не ковалентные взаимодействия описываются не только через вклад электростатических взаимодействий, но и за счет включения двухтельного потенциала растяжения Морзе. За счет чего авторы демонстрируют адекватное описание как четырех-, так и шести координированного атома кремния. Именно поэтому данные подходы широко применяются в современных исследованиях поведения силикатов, золь-геля, кварцево-подобных структур и других кремний

содержащих соединений и растворов (Rimsza *et al.*, 2017, Pitman *et al.*, 2012, Rimsza *et al.*, 2018, Rimsza and Du, 2018).

В работе Rimsza с соавторами проведено широкомасштабное моделирование поведения системы, состоящей из нескольких фазовых состояний оксида кремния: силикаты, золь-гель и вода (Rimsza *et al.*, 2017). В основе лежало модифицированное силовое поле ReaxFF_{SiO} (Duin *et al.*, 2003). С последующей репараметризацией на основе данных *ab initio* (Yeon *et al.*, 2016).

Общая энергия системы складывается из суммы (Duin *et al.*, 2003):

$$E_{total} = E_{bond} + E_{over} + E_{under} + E_{LP} + E_{val} + E_{pen} + E_{tors} + E_{conj} + E_{VDW} + E_{Coul}.$$

Общий размер системы, изучаемой Rimsza с соавторами, составляет более 12000 атомов. Классическое молекулярное моделирование проводилось при температурах 300К, 500К, 700К и 900К, с шагом в 0,25фсек и общим временем динамики, равной 1 нсек.

В ходе молекулярной динамики кремниевых кислот при разной пористости среды геометрия углов молекулы ортокремневой кислоты, изменяется в незначительных пределах (Rimsza *et al.*, 2017). Так среднее отклонение \angle Si-O-Si (атомы силоксановой связи) составляет 3,9% от референтного значения, полученного методом электронной дифракции. Среднее значение \angle O-Si-O совпадает с экспериментальным значением, полученным методом электронной дифракции и изменяется в диапазоне $\pm 14^\circ$ (таблица).

Исследование, выполненное Du и Li с реализацией сливового поля ReaxFF (Huff *et al.*, 1999) продемонстрировало, что происходит стабилизация количества олигомеров с течением времени. И отмечено, что после примерно одной нс МД соотношение олигомеров Q1:Q2:Q3 составляет 40%:30%:10% от общего количества и остается постоянной до конца изучаемой траектории (3нс). Кроме того, изучалось поведение системы при разных температурных показателях (1500К, 2000К, 2500К и 3000К) и отмечено, что температура влияет лишь на скорость наступления равновесия, но не на профиль поведения молекулярной системы (Rimsza and Du, 2018). Рассчитанные энергетические барьеры реакции

конденсации кремниевых олигомеров в среднем составило 109 кДж/моль для набора параметров ReaxFF – Fogarty и 160 кДж/моль для ReaxFF – Yeon (Rimsza and Du, 2018). В то время как, согласно экспериментальным данным энергетические барьеры реакции конденсации кремниевых олигомеров лежат в диапазоне 50 - 63 кДж/моль (Pereira *et al.*, 1998), а в по результатам *ab initio* расчетов - 96 кДж/моль (Garofalini *et al.*, 1994).

Jose Soler с соавторами (Soler *et al.*, 2002) предложили самосогласованный DFT метод расчетов, основанный на расчетах гибких линейных атомных орбиталей (LCAO) с N-мерным масштабированием. Данный подход позволяет быстро моделировать сложные, большие по размеру системы, варьируя сложность вычисления и точность полученных данных (Soler *et al.*, 2002). Данный метод позволяет проводить *ab initio* расчеты электронной структуры, а также молекулярное моделирование как отдельных молекул, растворов, так и твердых веществ (SIESTA, 2016).

Laurrabaquio с соавторами продемонстрировали применение метода к изучению поведения кристаллической решетки β -кристаболита методом *ab initio* МД (Laurrabaquio *et al.*, 2019), в программе (SIESTA, 2016). Им удалось продемонстрировать появление структур с двухчленным кольцом, трехкоординированного кислорода, образование топологических дефектов поверхности. Моделируемая система β -кристаболита была представлена 648 атомами. Следует отметить что, МД проходила при температуре 3400К, с шагом итерации в 0,001ps, в течение 60000 шагов (60 ps).

Отмечается что атомы водорода в воде диффундируют на 10–30% быстрее, чем атомы кислорода, что может стать существенным фактором изучения характера полимеризации и обоснования выбора силового поля для моделирования (Rimsza *et al.*, 2016).

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Молекулярные модели

В базе данных Protein Data Bank силикатеин- α представлен двумя структурами, модели которых получены с применением рентгеноструктурного анализа. Модель (pdb 6ZQ3) — силикатеина- α получена из организма *T. aurantium* (Görlich *et al.*, 2020) и модель химерного белка «4SER» катепсина L человека (pdb 2VHS), приближенная к структуре силикатеина- α и обладающая максимальной кремний полимеризующиеся активностью (Fairched *et al.*, 2009). В базе данных модель трехмерной структуры 2VHS представлена как комплекс из четырех идентичных глобул АБВГ, каждая из которых в отдельности обладает кремний полимеризующей активностью (Fairched *et al.*, 2009). Рентгеноструктурная модель 6ZQ3 получена в комплексе с силикатами, в то время как «4SER» 2VHS — водорастворимая форма. При построении модели 6ZQ3 авторы в качестве базисной структуры использовали имеющуюся «4SER» 2VHS (одну из цепей) с сохранением имеющихся погрешностей в составе цепи (Görlich *et al.*, 2020 , Fairched *et al.*, 2009). На основании сходства первичной последовательной и пространственной структуры в качестве первой молекулярной модели силикатеина- α в этой работе выступала модель структуры 2VHS.

Второй молекулярной моделью силикатеина- α в представляемой работе является предсказанная методом *ab-initio* по первичной последовательности структура пре-силикатеина- α из организма *T. aurantium* (код NCBI: AAC23951.1), содержащая (303 а.о.) :

```

1  MYLGTLVVLC VLGAAIGEPM PQYEFKEEWQ LWKKQHDKSY STNLEELEKH LVWLSNKKYI
61  ELHNANADTF GFTLAMNHLG DMTDHEYKER YLTYTNSKSG NYTKVFKREP WMAYPETVDW
121 RTKGAVTGIK SQGDCGASYA FSAMGALEGI NALATGKLT YLSEQNIIDCS VPYGNHGCKG
181 GNMYVAFLYV VANEGVDDGG SYPFRGKQSS CTYQEYRGA SMSGSVQINS GSESDLEAAV
241 ANVGPVAVAI DGESNAFRFY YSGVYDSSRC SSSSLNHAMV ITGYGISNNQ EYWLAKNWSG
301 ENWGELGYVK MAMKYNQCG IASDASYPTL

```

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

2.2 Поиск конформаций активного центра силикатеина- α для инициации процесса олигомеризации кремниевых кислот

2.2.1 Подготовка молекулярной модели структуры силикатеина- α

В работе была использована структура мутантной формы 4SER белка катепсина-L *Human sapiens* (код в Protein Data Bank — 2VHS). В базе данных модель трехмерной структуры представлена как комплекс из четырех идентичных глобул АБВГ (Fairched *et al.*, 2009, Приложение А, рисунок 1). Модель получена методом рентгеноструктурного анализа, с разрешением в $1,5\text{\AA}$ и состоит из 4. Для исследования был выбран А-домен (2VHS-A). Модель структуры 2VHS-A была очищена от примесей, добавлены атомы водорода, согласно валентности с использованием программы Gromacs-3.3.1 (Spoel *et al.*, 2019) с образованием системы, состоящей из 3209 атомов. Полученная система была растворена и центрирована в коробке воды размером $77,86 \times 67,01 \times 63,86\text{\AA}$ в программе Gromacs-3.3.1 с потенциалом Amber99 (Wang *et al.*, 2000). В результате система состояла из 33359 атомов. Минимизация и МД проводилась в программе Gromacs, согласно протоколу (Yang *et al.*, 2007), в течение 3 нс, при температуре 300 К, с учетом модели растворителя PCM (Fennell and Gezelter, 2006). На основании предварительных экспериментов радиус отрезания дальних электростатических взаимодействий составил 8\AA (Акберова с соавт., 2008). На 0,3 нс симуляции среднее квадратичное отклонение α -домена 2VHS в ходе МД выходит на плато. Структура модели фермента оценивалась по изменению следующих параметров: среднеквадратичное отклонение (RMSD), радиус гирации, поверхность доступная растворителю, а так же подвижность аминокислот активного центра. Полученные данные анализировали с помощью программного пакета VMD (Humphrey *et al.*,

1996), а также дополнительных скриптов, написанных на языке Python. Использовался разработанный подход, который был апробирован для моделирования взаимодействия различных макромолекул с лигандами, в том числе и для изучения взаимодействия линолевой кислоты с ДНК в водном растворе (Тарасов с соавт., 2012).

2.2.2 Подготовка модели субстрата - $\text{Si}(\text{OH})_4$

Молекула ортокремниевой кислоты была построена в программе ChemCraft (Chemcraft, 2019). Расчеты произведены с помощью пакета PCGAMESS/Firefly (Gordon *et al.*, 2005). Оптимизация геометрии молекул проводилась методом теории функционала плотности (DFT) с функционалом X3LYP (Xu and Goddard, 2004) в валентно-расщепленном базисе 6-31G(d) с последующим пересчетом структуры в базисе 6-311++G(2d, p).

2.2.3 Подготовка 8 конформационных изомеров модели каталитической триады силикатеина- α с субстратом $\text{Si}(\text{OH})_4$

Для квантово-химических расчетов взаимодействия ортокремниевой кислоты с активным центром силикатеина- α были использованы конечные после проведения МД координаты аминокислотных остатков, входящих в состав активного центра (His163, Ser25, Gln19). Для имитации соединения аминокислот активного центра с полипептидной цепочкой была проведена фиксация атомов С и N, входящих в состав пептидной связи по трем пространственным координатам (X, Y, Z).

Взаимная начальная ориентация каталитической триады и субстрата была проведена в программе ChemCraft (Chemcraft, 2019) с последовательной оптимизацией геометрии и уточнением структуры в программе PCGAMESS/Firefly (Gordon *et al.*, 2005), включающие полуэмпирический метод AM1 и метод DFT с функционалом X3LYP в базисе 6-31G(d)/ DFT с функционалом X3LYP (Xu and Goddard, 2004) в базисе 6-311++G(2d,p) (рисунок

2.1). Эффекты растворителя учитывались с помощью модели поляризуемого континуума (PCM) (Miertus *et al.*, 1981). Для расчета частичных атомных зарядов использовалась зарядовая схема Малликена.

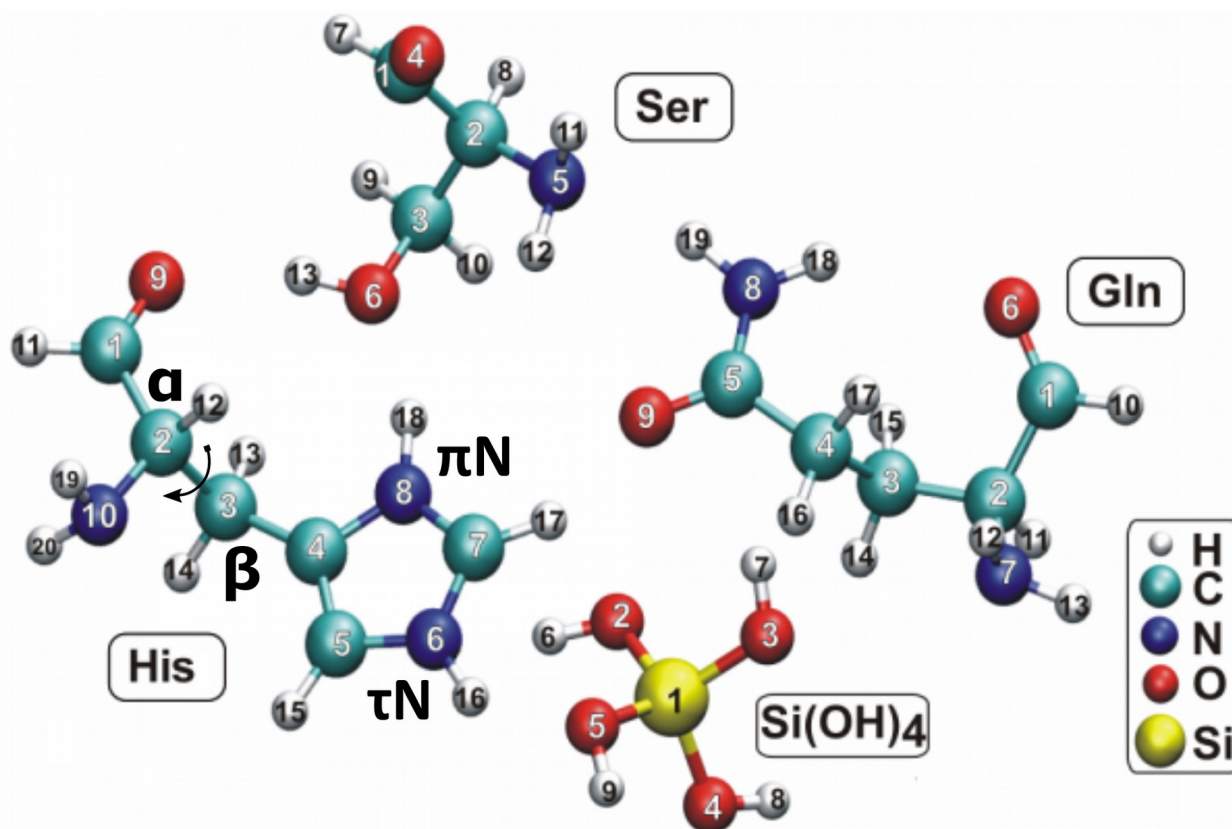


Рисунок 2.1 - Активный центр силикатеина-α (Hys163, Ser25, Gln19) с помещенным в него субстратом Si(OH)₄, все атомы пронумерованы

При физиологических условиях атомы азота имидазольного кольца гистидина могут находиться как в протонированном, так и в депротонированных состояниях (рКа имидазольного кольца близко к 7.0). Это позволяет предположить, что атомы азота имидазольного кольца могут выступать в роли как доноров, так и акцепторов H⁺. За счет степени протонирования азотов имидазольного кольца His и его вращения относительно связи Cα–Cβ сконструировано восемь начальных состояний активного центра (рисунок 2.1).

2.2.4 Расчет энергии связывания и геометрии комплекса каталитическая триада–Si(OH)₄

Стационарные состояния каталитической триады силикатеина- α рассчитывались методом теории функционала плотности (DFT) в функционале X3LYP (Xu and Goddard, 2004) в валентно-расщепленном базисе 6-31G(d)/6-311++G(2d, p), с учетом модели растворителя PCM. Расчеты производились в программе PCGAMESS/Firefly (Gordon *et al.*, 2005). Для каждого состояния рассчитывалась энергия связывания и константа равновесия (K_p).

K_p – количественная мера показателя равновесия ферментативной реакции (при постоянной θ и давлении окружающей среды). Зная изменение свободной энергии Гиббса (ΔG) (формула 2.1), можно вычислить K_p (формула 2.2).

$$\Delta G = -2,3 \times RT * \lg(K_p) \quad (2.1)$$

$$K_p = 10^{(\Delta G / (-2,32 \times RT))} \quad (2.2)$$

где ΔG – изменение свободной энергии Гиббса; R - газовая постоянная (19,86*10⁻⁴ кал/(моль*K)); T – температура, Кельвин.

2.2.5 Расчет и построение поверхности потенциальной энергии перемещения H⁺ вдоль вектора водородной связи каталитическая триада - Si(OH)₄

Анализ стационарных конформаций, полученных после оптимизации геометрии комплекса каталитическая триада-Si(OH)₄, показал наличие коротких донорно-акцепторных взаимодействий. Данные взаимодействия делают потенциально возможным перемещение H⁺ от атома донора к акцептору (Salna *et al.*, 2017; Vera *et al.*, 2017). Вдоль вектора перемещения H⁺ от донора к акцептору, все расстояние было разделено на 10 равных отрезков. В каждой точке вдоль вектора перемещения была рассчитана энергия системы в программе PCGAMESS/Firefly (Gordon *et al.*, 2005) методом DFT, в функционале X3LYP (Xu and Goddard, 2004) в валентно-расщепленном базисе 6-311++G(2d,p). Расчеты проводились в газовой фазе с использованием модели поляризованного континуума (PCM).

После оптимизации комплекса каталитическая триада-Si(OH)₄ образовалось несколько взаимных ориентаций субстрата и фермента. Данные координаты были использованы для расчета энергетического барьера прямой и обратной реакции переноса протона с азота имидазольного кольца His163 на ортокремневую кислоту. Поскольку перемещение протона осуществляется в условиях донорно-акцепторных взаимодействий, можно предположить, что протон способен туннелировать (Salna *et al.*, 2017) между электроотрицательными атомами азота His163 и кислорода Si(OH)₄.

В результате поверхность потенциальной энергии (ППЭ) перемещения H⁺, оценивалась в расчетах, в которых отличались только координаты самого H⁺. В структуре изменялось положение H⁺ вдоль вектора (N-His163, O-Si(OH)₄). Шаг смещения составил 1/13 нормированного вектора (N-His163, O-Si(OH)₄).

Энергетический барьер прямой и обратной реакции перемещения H⁺ рассчитан относительно начальной конформации комплекса. Серия конфигураций комплекса с измененным положением H⁺ была подготовлена с использованием языка программирования Python (Python, 2021).

2.3 Поиск областей связывания силикатеина – α с избранными олигомерами кремниевых кислот

2.3.1 Подготовка молекулярных моделей силикатеина-α

Первая модель.

Трехмерная структура химерной формы 4SER катепсина L получена из Protein Data Bank (pdb 2VHS), очищена от примесей. Молекулярная динамика проведена в пакете NAMD Namd NAMD- multicore CUDA (Phillips *et al.*, 2005) с использованием силового поля CHARMM36 (Brooks *et al.*, 2009). Подготовка структуры к МД проводилась в программе VMD и включала: построение файла структуры, добавления ячейки растворителя (воды TIP3P) и добавление ионов Na⁺

и Cl^- до концентрации 0,15 М/л (физраствор), рН 7,0. Размер периодической ячейки составил $92 * 87 * 74 \text{ \AA}$.

Подготовка к молекулярной динамике в NAMD (Phillips *et al.*, 2005) включала следующие этапы: минимизация (2 нс), нагрев (до 310К, 0,3нс) и эквilibрация (2нс). Подготовленная и уравновешенная система была поставлена на расчет МД, продолжительность которой составила 25нс с шагом итерации 1фс.

Координаты структуры белка из траектории МД были оценены на наличие запрещенных углов ψ и ϕ по карте Рамачандрана (UCSF Chimera, версия 1.15), рассчитаны среднеквадратичное отклонение (RMSD) всей структуры белка, среднеквадратичное отклонение аминокислот активного центра (RMSF), а так же проведена оценка изменения расстояний между выбранными парами атомов. RMSD, RMSF и динамика расстояний рассчитаны в VMD, визуализированы с использованием Python 3.7, модуль matplotlib.

Вторая модель.

По последовательности пре-силикатеина- α (кодом AAC23951.1) на веб-сервиса Robetta (Kim *et al.*, 2004) и QUARK было пересказаны 20 моделей структуры. Оптимальная модель пре-силикатеина- α была выбрана на основании лучшей QMEAN-оценки и отсутствию запрещенных аминокислот на карте Рамачандрана.

2.3.2 Подготовка моделей природных субстратов силикатеина- α

2.3.2.1 Построение системы с разной долей ортокремниевой кислоты, растворенной в воде

Начальная молекулярная система представлена равноудаленными молекулами ортокремниевой кислоты ($\text{Si}(\text{OH})_4$), расположенными в периодической ячейке $58,44 \times 58,44 \times 58,44 \text{ \AA}$. Образовавшаяся молекулярная система заполнена молекулами воды (TIP3P) до получения плотности 1 г/см^3 . Сконструированная система равноудаленных олигомеров кремниевых кислот в

водном растворе была построена с использованием разработанного кода программы на языке программирования Python, растворение и центрирование двух систем происходило в программе VMD.

Исследовались две системы:

- а) система45 - модель с концентрацией ортокремниевой кислоты $0,45\text{г/см}^3$, содержащая 576 мономеров $\text{Si}(\text{OH})_4$ и 5220 молекул H_2O , всего атомов 20844:
- б) система56 - модель с концентрацией ортокремниевой кислоты $0,56\text{г/см}^3$, содержащая 729 мономеров $\text{Si}(\text{OH})_4$ и 3026 молекул H_2O , всего атомов 15638.

Молекула $\text{Si}(\text{OH})_4$ была предварительно оптимизирована (раздел 2.2.2)

2.3.2.2 Моделирование процесса олигомеризации кремниевых кислот в водном растворе

В работе используется реакционный межатомный потенциал, разработанный Feuston и Garofalini (FG), реализованный в программном пакете GRAMP (Изотова с соавт., 2020; Tarasov *et al.*, 2010). Потенциал является полностью атомарной моделью описания взаимодействий атомов Si, O и H.

Общий потенциал реакционного поля FG (2.3) складывается из двухтельного потенциала Борна-Майера-Хаггинса (2.4) и обобщенного трехтельного потенциала Стиллингера-Вебера (Feuston and Garofalini, 1990) (2.5).

$$V(\{R_i\}) = \sum_{ij} V_2(r_i, r_j) + \sum_{ij,k} V_3(r_i, r_j, r_k), \quad (2.3)$$

где $\{R_i\} = (r_1, r_2, \dots, r_n)$ для n -атомной системы.

$$V_2(r_i, r_j) = V_{r_{ij}}^{BMH} = A_{ij} \exp\left(\frac{-r_{ij}}{\rho_{ij}}\right) + Z_i Z_j \operatorname{erfc}\left(\frac{r_{ij}}{\beta_{ij}}\right) / r_{ij}, \quad (2.4)$$

где $r_{ij} = r_i - r_j$ - радиус вектор; Z - величина заряда; A, b, p - эмпирические параметры.

$$V_3(r_i, r_j, r_k) = v_3(r_{ij}, r_{jk}, \theta_{jik}) + v_3(r_{jk}, r_{ji}, \theta_{kji}) + v_3(r_{ki}, r_{kj}, \theta_{ikj}), \quad (2.5)$$

где

$$v_3(r_{ij}, r_{jk}, \theta_{jik}) = \lambda_{jik} \exp \left[\frac{Y_{ij}}{(r_{ij} - r_{ij}^0)} + \frac{Y_{ik}}{(r_{ik} - r_{ik}^0)} \right] \times \left[\cos(\theta_{jik}) - \cos(\cos_{jik}^0) \right]^2,$$

где $r_{ij} < r_{ij}^0$ и $r_{ik} < r_{ik}^0$; θ_{jik} - угол между двумя векторами r_{ij} и r_{ik} ; λ и γ — эмпирические параметры. Для каждого i - атома определяются ближайшие соседи, для составления троек при расчетах потенциала Стиллингера-Вебера.

Потенциал Борна-Майера-Хаггинса (2.4) описывает электростатическое отталкивание атомов на коротких дистанциях и притяжение на дальних. Кулоновское взаимодействие описывается суммой Эвальда (Ewald, 1921; Kholmurodo et al., 2003). Порог отрезания потенциала составляет 5,5Å. Потенциал Стиллингера-Вебера описывается значением отношения текущего угла к оптимальному углу в градусах (2.5). Заряды на атомах представлены формализованными параметрами Si^{+4} , O^{-2} , H^{+1} . Трехтельный компонент описывается значением текущего угла к оптимальному углу, в градусах. Потенциал описывает поведение кислорода, как реакционно способной частицы, способной входить в состав как молекулы воды, так и в систему кремнезема. Это приводит к возможности описания реакций как диссоциации, так и образования ковалентных связей. Данный подход возможен благодаря использованию потенциала RSL2, описывающего поведение молекул воды.

Для расчета парных взаимодействий для каждого атома создается список ближайших соседей (Verlet list), который так же используется при расчете трехтельных взаимодействий. Сила на каждом атоме рассчитывалась как производная первого порядка.

Эквилибрация системы проводилась при температуре 300К в течение 10пс. Моделирование выполнялось при температуре 2500К. Высокая температура является частью стандартной методики для ускорения процесса полимеризации кремниевых кислот с рабочим диапазоном температур 1500 — 3000К (Hirakawa et al., 2017; Stawicka et al., 2020). Интеграция уравнений движения производилась с

помощью алгоритма Верле с шагом 0,001пс. Траектория движения атомов записывалась с шагом 0,1пс. Продолжительность траектории МД составила 3нс для каждой системы. Такое время симуляции выбрано на основании работы (Rao and Gelb, 2004), в которой продемонстрировано, что небольшие олигомеры образуются на первых 3-5нс МД, на следующем этапе происходит агрегация образованных олигомеров.

2.3.2.3 Оценка воспроизводимости геометрических параметров образующихся олигомеров кремниевых кислот

Целостность и согласованность поведения молекулярной системы кремниевых кислот в водном растворе на каждом шаге МД оценивалась по следующим параметрам:

- 1) Стабильность валентных длин связей (Si-O), и валентный углов \angle Si-O-Si и \angle O-Si-O.

Длина связей Si-O рассчитывалась для всей молекулярной системы на каждом шаге МД, по формуле (2.6):

$$\text{Длина (Si—O)} = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2} \quad (2.6)$$

где x, y, z - координаты атомов i и j , в декартовой системе координат. Порог отсечения образовавшейся ковалентной связи осуществлялся на расстоянии между атомами в 1,8Å, при заложенном значении в силовом поле $FG = 1,65\text{Å}$.

Валентный угол (Si-O-Si) и (O-Si-O) рассчитывался для всей молекулярной системы на каждом шаге МД, по формуле (2.7):

$$\text{Угол} = \arccos\left(\frac{a_x * b_x + a_y * b_y + a_z * b_z}{\sqrt{a_x^2 + a_y^2 + a_z^2} * \sqrt{b_x^2 + b_y^2 + b_z^2}}\right) \quad (2.7)$$

где a, b — вектора между двумя ковалентными связями, в пересечении которых находится общий атом. Поиск валентных углов осуществлялся на основе сформированного множества ковалентных связей.

- 2) Доля средней степени координированности атомов Si, которая вычислялась на каждом шаге МД. Для этого подсчитывалось количество ковалентных

связей Si-O, образовавшихся для каждого атома Si. На следующем шаге проводилась группировка атомов Si на основе количества выявленных ковалентных связей (формула 2.6). Результат представлялся как доля атомов Si со степенью координированностью N от общего числа атомов Si.

- 3) Время жизни силанольных и силоксановых связей в образующихся олигомерах. Для оценки данного параметра был выбран самый крупный олигомер, образовавшийся на последнем шаге МД, и отслежено назад по траектории наличие ковалентных связей в составе олигомера, с разделением их на 2 класса: силанольные Si—O---H и силоксановые Si—O---Si.
- 4) Анализ доли связанного и свободного H⁺. Для анализа связанного и свободного иона водорода был проведен анализ длин связей для O-H, согласно формуле 2.6. После данной оценки все водороды системы были разделены на группы «водород связанный» и «водород свободный». Значения представлены в долях от общего числа атомов водородов.

Для увеличения скорости вычислений предварительно все атомы системы были разделены на группы: Si, O - молекулы кремниевой кислоты, O - молекулы воды, H - молекулы кремниевой кислоты, H — молекулы воды. Для каждого этапа оценки системы был разработан и реализован код программы на языке программирования Python.

Расчет геометрических параметров моделируемой системы проводился с учетом размеров периодической ячейки, в которой проводился расчет МД молекул кремниевых кислот и воды.

Распределения длин ковалентных связей и валентных углов были проверены на нормальность, используя критерий Шапиро-Уилка и K²-тест Д'Агостино. Для сравнения двух выборок применялся U-критерий Манна-Уитни, для множественного сравнения данных - тест Крускала-Уоллиса (Python, библиотека SciPy).

2.3.2.4 Алгоритм поиска и кластеризации олигомеров кремниевых кислот в траектории МД

Восстановление структуры образовавшихся олигомеров кремниевых кислот проходило при участии только связей Si-O и осуществлялась по следующей схеме:

- 1) Составление множества пар атомов Si-O, по формуле 2.6;
- 2) Процедура восстановления одного олигомера представляла из себя рекурсию, по начальному множеству пар Si-O до тех пор, пока множество пар Si-O искомого олигомера не перестало изменяться;
- 3) Исключение из начального множества пар Si-O, вошедших в состав искомого олигомера;
- 4) Восстановление структуры следующего олигомера.

Координаты структуры каждого восстановленного олигомера сохранялись для дальнейшей работы. Кроме пространственных координат каждого атома сохранялась сеть ковалентных связей Si-O. Полученная сеть ковалентных связей использовалась как основа для построения молекулярного ненаправленного графа для всех атомов Si олигомера. В основе кластеризации восстановленных олигомеров лежит разделение их на группы на основании построенных молекулярных графов. Кластеризация моделей олигомеров и их графовые формы были построены на языке программирования Python и библиотеки NetworkX (NetworkX, 2020)

2.3.2.5 Анализ олигомерного разнообразия кремниевых кислот

Среди полученных данных о графовых видах олигомеров кремниевых кислот проведена оценка наиболее высокочастотных олигомеров за весь период МД, оценена доля циклических и разветвленных форм. Выделены интересные графовые формы, которые являются шаблонами для построения более сложных структур. Для циклического тримера и бициклического тетрамера отслежена траекторий индивидуальных событий, которые привели к его формированию.

2.3.2.6 Оптимизация моделей субстратов кремниевых кислот методами квантовой химии

Конформации кремниевых кислот со степенью олигомеризации от 1 до 6, полученные в результате МД в реакционном силовом поле FG были оптимизированы с использованием программного пакета ORCA (Neese, 2017). Расчеты проводились методом теории функционала плотности (DFT) с гибридным функционалом B3LYP и базисным набором 6-311G.

2.3.3 Молекулярный докинг олигомеров кремниевых кислот в силикатеин- α

Области взаимодействия силикатеина- α с молекулами кремниевых кислот оценивались по результатам молекулярного докинга с гибким лигандом. В качестве структуры фермента использовались подготовленные модели химерной формы 2VHS (силикатеин- α) и пре-силикатеина- α *Tethya aurantium* (NCBI: AAC23951.1).

Поиск областей связывания фермента и лиганда проходил в два этапа:

Глобальный поиск по всей поверхности: лигандом выступала молекула ортокремниевой кислоты $\text{Si}(\text{OH})_4 - \text{Q}^0_1$ (подготовка раздел 2.11, рисунок 2.2). На основании проведенного исследования были выделены три потенциально значимые области.

Локальный поиск по трем областям связывания был проведен с 14-тью лигандами (подготовка раздел 2.11), с радиусом поиска от выбранной точки — 30Å.

Для структуры пре-силикатеина- α , AAC23951.1, координаты докирования:

- 1) Asp68, xyz: 3,4; -11,3; -1,1;
- 2) Thr329, xyz: 43,4; 4,4; -12,8;
- 3) Ser131, xyz: 32,9; -10,1; 11,3 (Ser25 в зрелом силикатеине- α).

Для структура химерной формы 2VHS, координаты докирования:

- 1) Asp6, xyz: -1,2; -37,5; 26,3;
- 2) Thr94, xyz: -21,3; -25,4; 4,2;

3) Ser25, xyz: -6,1; -27,2; 9,4 .

Для каждой области методом Монте-Карло было сгенерировано 500 положений. На основании энергии связывания были выделены все состояния, энергия которых имеет отрицательное значение. Для визуализации областей связывания были использованы 20 состояний с наименьшей энергией связывания. Для проведения молекулярного докинга использовались сервисы BSP-SLIM (Deluca *et al.*, 2015) и ROSIE (Lee and Zhang, 2012; Lyskov *et al.*, 2013) .

ГЛАВА 3. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ СИЛИКАТЕИНА-А ДЛЯ НАЧАЛЬНОГО ЭТАПА ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ $\text{Si}(\text{OH})_4$

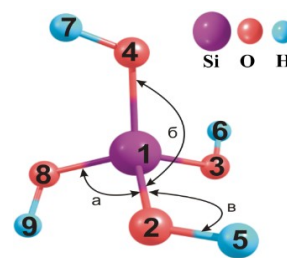
3.1 Построение модели $\text{Si}(\text{OH})_4$

В качестве субстрата во всех исследованиях реакции конденсации кремниевых кислот на начальном этапе построения системы выступала молекула ортокремневой кислоты ($\text{Si}(\text{OH})_4$), предварительно оптимизирована методом теории функционала плотности (DFT) (Раздел 2.2.2).

Значение длины связи между кислородом и водородом в молекуле $\text{Si}(\text{OH})_4$ составляет $0,967 \text{ \AA}$, длина связи кремний-кислород составляет $1,653 \text{ \AA}$, для всех групп. Значения углов разделяются на 3 типа (Таблица 3.1): тип «а» - равен 106° , тип «б» - $116,5^\circ$ тип «в» - $113,5^\circ - 113,6^\circ$.

Таблица 3.1 - Геометрия молекулы ортокремневой кислоты

Тип	Значения параметров
Связь Si-O	$1,62 \text{ \AA}$
Связь O-H	$0,97 \text{ \AA}$
O2-Si1-O4 и O3-Si1-O8	$116,6^\circ$
O4-Si1-O8, O2-Si1-O8 и O3-Si1-O4	106°
O2-Si1-O3	$106,1^\circ$
Si1-O2-H5, Si1-O3-H6, Si1-O4-H7, Si1-O8-H9	$\Delta 113,55^\circ$



Полученные геометрические характеристики углов и длин связей в $\text{Si}(\text{OH})_4$ согласуются как с ранее проведенными квантовохимическими расчетами, так и с экспериментальными значениями (Приложение А, таблица 1).

3.2 Оценка подвижности силикатеина- α в ходе МД

В ходе МД RMSD мутантного силикатеина- α выходит на плато с $0,6 \text{ нс}$ и колебания составили не более $1,5 \text{ \AA}$, радиус гирации колеблется в диапазоне $34,6 - 34,9 \text{ \AA}$. В первые $0,03 \text{ нс}$ наблюдается расширение поверхности структуры с последующим колебанием в диапазоне $42000 - 44000 \text{ \AA}^2$. Наблюдается

незначительное колебание АО активного центра (АЦ) в ходе МД. Если оценивать изменение площади треугольника, образованного между аминокислотными остатками АЦ: $\tau\text{N His}$, O — радикала Ser (O-Ser) и O — радикала Gln (O-Gln), то средняя площадь треугольника составляет $6,5\text{\AA}^2$, при длинах $\tau\text{N His}$ — O-Ser в $4,99\text{\AA}$; O-Ser — O-Gln в $5,082\text{\AA}$ и $\tau\text{N His}$ — O-Gln в $9,63\text{\AA}$.

3.3 Характеристика стационарных состояний каталитической триады силикатеина- α субстратом и без него

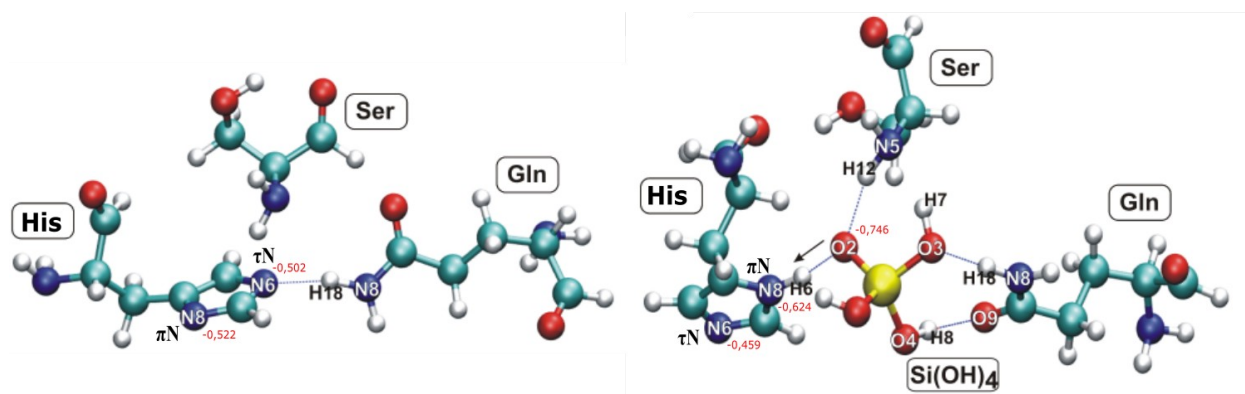
Конформация фермента в последней точке МД была использована для извлечения координат активного центра и подготовки к серии оптимизаций.

Константы диссоциации атомов азота имидазольного кольца полиHis цепи отличаются. Для τN $pK_a = 6,14$, а для πN $pK_a = 13,1$ (Liang *et al.*, 2009). При нормальной температуре и физиологическом значении pH ($pH = 6,6$) равновесие таутомерных форм сдвинуто на частичное протонирование имидазольного кольца, где 80 % приходится на протонирование πN и 20 % на τN , а состояния полного протонирования или депротонирования маловероятны (Hansena and Kaya, 2014).

За счет степени протонирования азотов имидазольного кольца His и его вращения относительно связи $C\alpha-C\beta$ сконструировано 8 состояний активного центра, которые были оптимизированы согласно протоколу (Раздел 2.2.4) и представлены ниже.

Состояние 1: депротонирование τN и πN атомов имидазольного кольца His и расположение πN кнаружи.

Первый вариант состояния активного центра характеризуется полностью депротонированной формой имидазольного кольца His (рисунок 3.1), в которой атом πN расположен кнаружи. В результате оптимизации образуется одна водородная связь между аминокислотными остатками His и Gln, длина которой равна $1,84\text{\AA}$. Парциальный заряд по Малликену на πN на 0,02 единиц превышает заряд на τN и составляет 0,522.



а)

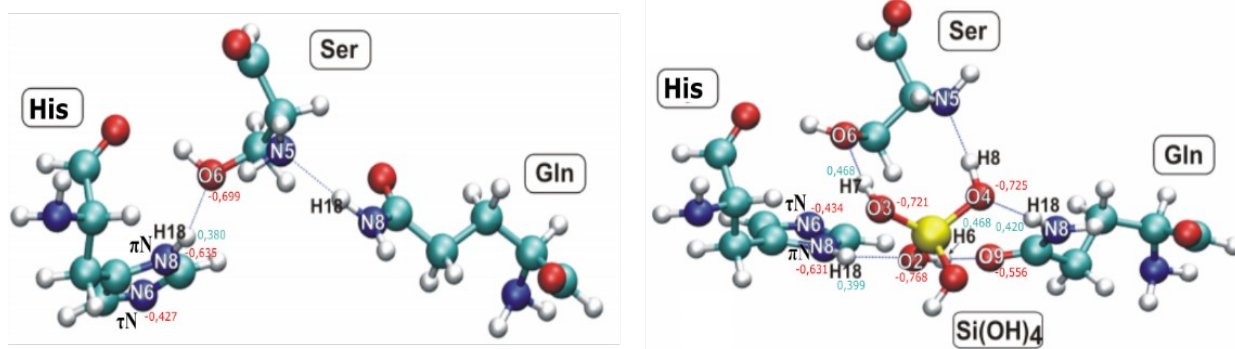
б)

Рисунок 3.1 – Оптимизированная конфигурация активного центра мутантного фермента силикатеина - α , с расположением πN имидазольного кольца His к субстрату. Где, а – каталитическая триада фермента, б – каталитическая триада и субстрат

После добавления субстрата и повторной оптимизации, в комплексе активный центр фермента – ортокремневая кислота, образуется 4 водородные связи (Приложение Б, таблица 1). Энергия связывания комплекса составляет – 32,82 ккал/моль. В ходе оптимизации имидазольное кольцо His поворачивается по отношению к субстрату и H^+ молекулы H_4SiO_4 переходит на πN имидазольного кольца His. Парциальный заряд по Малликену на πN возрастает до 0,624. На кислороде образуется сильный частичный отрицательный заряд (-0,746), что в дальнейшем может привести к конденсации молекул H_4SiO_4 по основному типу.

Состояние 2: протонирование πN атом имидазольного кольца His и расположение πN кнаружи.

Второе состояние активного центра частично протонировано по положению πN в имидазольном кольце His, который так же расположен кнаружи (рисунок 3.2, а). На πN присутствует более электроотрицательный парциальный заряд -0,635, по сравнению с -0,427 на τN (рисунок 3.2, б).



a)

б)

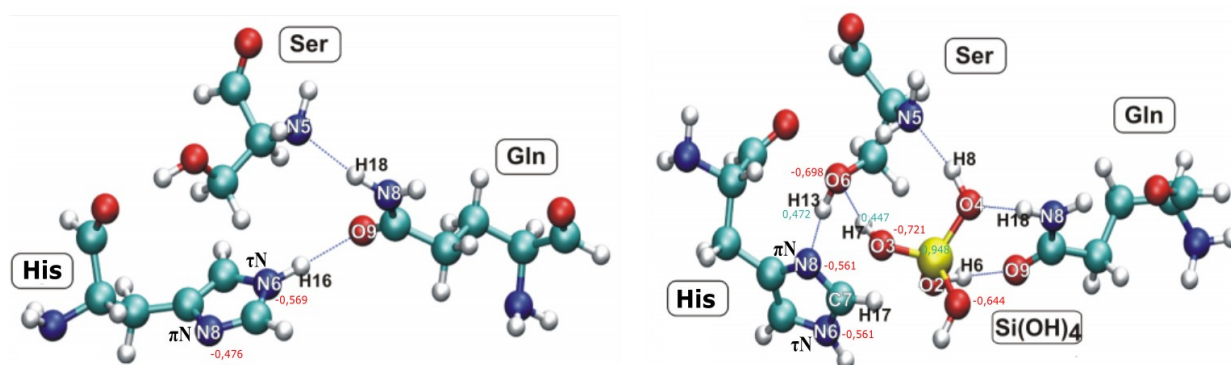
Рисунок 3.2 – Оптимизированная конфигурация активного центра силикатеина – α , с протонированием πN имидазольного кольца His и расположением πN кнаружи. Где, а – каталитическая триада фермента, б – каталитическая триада и субстрат

При добавлении в полость активного центра молекулы $\text{Si}(\text{OH})_4$ в системе происходит разворот His к субстрату и стабилизация его водородными связями. Интересно, что образуется две водородные пары, лежащие на одной линии, это: His $\text{H}_{18} - \text{O}_2 \text{Si}(\text{OH})_4$ и $\text{Si}(\text{OH})_4 \text{H}_6 - \text{O}_9 \text{Gln}$ (Приложение Б, таблица 2). Данное расположение водородных связей с более электроотрицательным атомом $\text{O}_2 \text{Si}(\text{OH})_4$, расположенным по центру позволяет предположить, что активация кремниевой кислоты возможна по боковому механизму.

Изучалась возможность протона H_{18} находиться вблизи кислорода субстрата, для этого протон был искусственно помещен вблизи ($0,96 \text{ \AA}$) $\text{O}_2 \text{Si}(\text{OH})_4$, после чего система была оптимизирована. В ходе оптимизации протон возвратился на πN имидазольного кольца His, в результате чего энергетически выгодное положение H^+ в поле πN , что подтверждается и увеличением водородной связи His $\text{H}_{18} - \text{O}_2 \text{Si}(\text{OH})_4$ в $1,96 \text{ \AA}$, против конфигураций в предыдущих положениях. Энергия связывания активного центра с субстратом составляет $-26,69$ ккал/моль.

Состояние 3: протонирование πN атом имидазольного кольца His и расположение πN кнаружи.

Состояние три характеризуется наличием двух водородных связей: между His и Gln, а также между Gln и Ser (рисунок 3.3). Несмотря на увеличение числа водородных связей расстояние между аминокислотными остатками His и Gln на 0,07 Å больше, по сравнению с первым рассмотренным состоянием (полностью депротонированная форма). При добавлении субстрата $\text{Si}(\text{OH})_4$, с последующей оптимизацией комплекса, наблюдается разворот имидазольного кольца (как в первом состоянии). Взаимодействие субстрата и аминокислотного остатка активного центра происходит на счет образования 4 водородных связей: по две связи между Gln - $\text{Si}(\text{OH})_4$ и Ser - $\text{Si}(\text{OH})_4$; и одна водородная связь между Ser и His (Приложение Б, таблица 3).



а)

б)

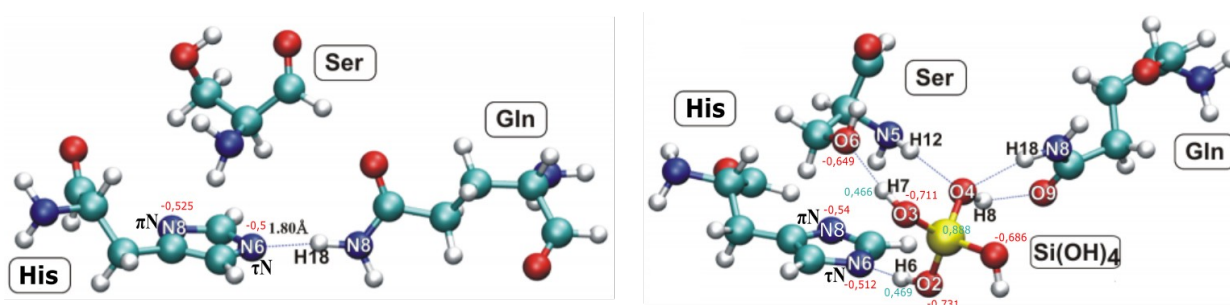
Рисунок 3.3 – Оптимизированная конфигурация активного центра силикатеина– α , с протонированием τN имидазольного кольца His и расположением πN к субстрату. Где, а – каталитическая триада фермента, б – каталитическая триада и субстра

Состояние 4: протонирование τN и πN атомов имидазольного кольца His и расположение πN кнаружи.

Четвертое состояние представляет собой полностью протонированную форму имидазольного кольца His, в которой кнаружи расположен атом πN . В ходе оптимизации наблюдается вращение имидазольного кольца His, относительно связи $\text{C}\alpha - \text{C}\beta$. Что приводит к переходу состояния четыре в другую конформацию (состояние восемь). Следовательно, состояние 4 не является стационарным.

Состояние 5: депротонирование τN и πN атомов имидазольного кольца His и расположение τN кнаружи.

Пятый вариант состояния активного центра характеризуется полностью депротонированностью имидазольного кольца His с расположением τN кнаружи (рисунок 3.4). В ходе оптимизации азоты кольца His не поворачиваются. Расстояние между аминокислотными остатками His и Gln немного меньше и составляет $1,8\text{\AA}$. После добавление в полость активного центра субстрата ($\text{Si}(\text{OH})_4$), происходит небольшая перестройка аминокислотного окружения. Молекула $\text{Si}(\text{OH})_4$ стабилизируется пятью водородными связями. Две водородные связи образуются с Gln, две с Ser и одна с His (Приложение Б, таблица 4)



а)

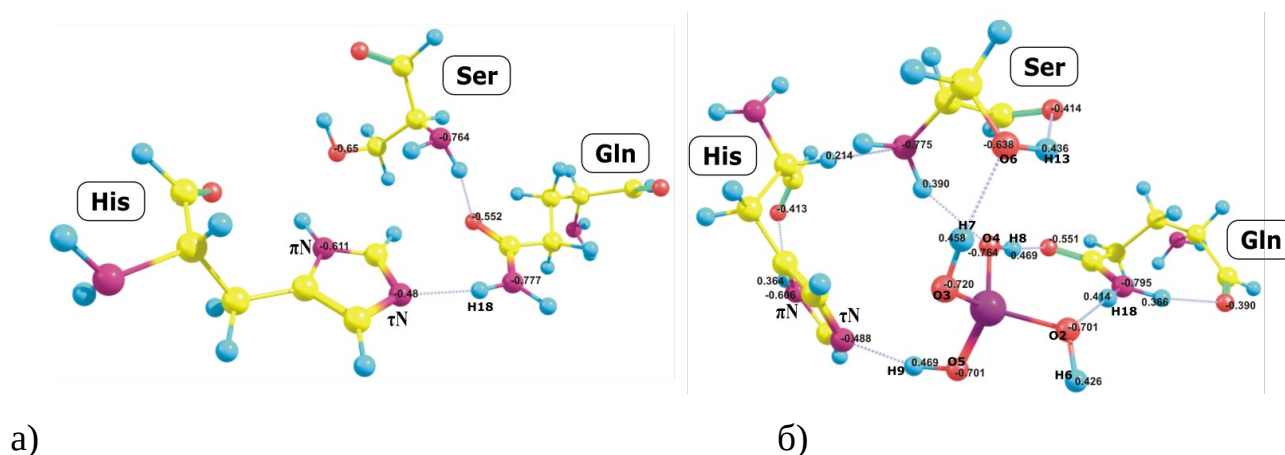
б)

Рисунок 3.4 – Оптимизированная конфигурация активного центра силикатеина– α с расположением τN имидазольного кольца His к субстрату. Где, а – каталитическая триада фермента, б – каталитическая триада и субстрат

Наименьшим парциальным зарядом по Малликену является атом кислорода O_2 молекулы $\text{Si}(\text{OH})_4$. Заряд которого равен $-0,731$, в то время кислород, участвующий в образовании водородной связи с Ser принимает значение $-0,711$. Кислород, не образующий водородную пару $-0,686$. Особый интерес представляет межмолекулярная связь His - $\text{Si}(\text{OH})_4$ с расстоянием в $1,64\text{ \AA}$. В результате, расстояние между атомами $\text{Si}(\text{OH})_4$ - O_2 и H_6 - $\text{Si}(\text{OH})_4$ удлинится до $1,03\text{\AA}$ (против канонической длины в $0,967\text{ \AA}$).

Состояние 6: протонирование π N атомов имидазольного кольца His и расположение τ N кнаружи.

Шестое состояние так же частично протонировано по π N имидазольного кольца His и в начальной конфигурации атом τ N располагается кнаружи (рисунок 3.5). В системе так же присутствует водородная связь между His и Gln, которая составляет $2,1\text{\AA}$. Атом азота π N имидазольного кольца His является более электроотрицательным, с частичным парциальным зарядом по Малликену - 0,611, по сравнению с атомом τ N с частичным парциальным зарядом по Малликену - 0,48.



а)

б)

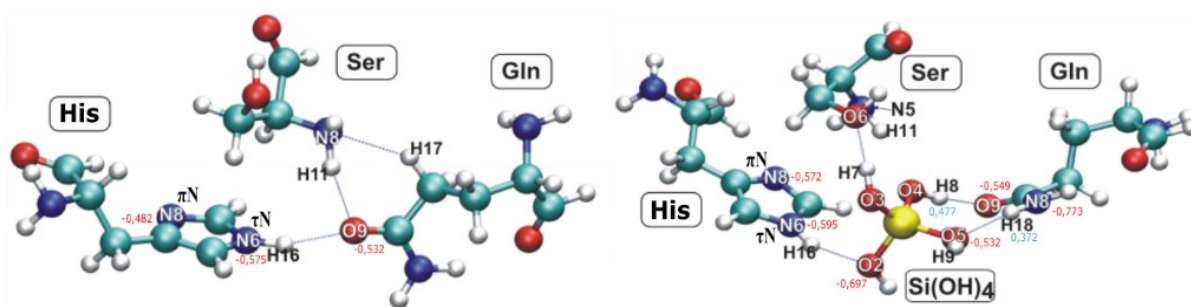
Рисунок 3.5 – Оптимизированная конфигурация активного центра силикатеина- α , с протонированием π N имидазольного кольца His и расположением τ N кнаружи.

Где, а – каталитическая триада фермента, б – каталитическая триада и субстрат

После помещения в активный центр $\text{Si}(\text{OH})_4$, с последующей оптимизацией между субстратом и аминокислотными остатками образуется пять водородных связей. По две связи с Gln и Ser и одна с His (Приложение Б, таблица 5). При этом имидазольное кольцо His сильно разворачивается с увеличением полости активного центра. Величина парциальных зарядов на атомах τ N и π N практически не изменяется. При этом происходит небольшое удлинение ковалентной связи $\text{O}_5 - \text{H}_9$ в молекуле $\text{Si}(\text{OH})_4$ на $0,03\text{\AA}$, по сравнению с каноническим значением.

Состояние 7: протонирование τ N атомов имидазольного кольца His и расположение τ N кнаружи.

Состояние семь представляет интерес тем, что протонирован τ N имидазольного кольца His, который расположен кнаружи. В оптимизированном состоянии имеется одна водородная связь между His H_{16} и O_9 Gln, длина которой $1,91\text{\AA}$. После добавления $\text{Si}(\text{OH})_4$ в полость активного центра между субстратом радикалами аминокислотных остатков образуется четыре водородные связи (таблица 3.7). Под действием Gln N_8 длина связи $O_5 - H_9$ в субстрате в субстрате незначительно увеличивается на $0,03\text{\AA}$ по сравнению длины в изолированной молекуле. Расстояние между двумя электроотрицательными атомами His τ N и O_5 $\text{Si}(\text{OH})_4$, образующие водородную пару располагаются на расстоянии $2,91\text{\AA}$ и лежат практически на одной линии (Приложение Б, таблица 6 (б)). Данное расположение предполагает возможность осуществления переноса протона с τ N His на O_5 $\text{Si}(\text{OH})_4$. Энергия связывания активного центра с субстратом составляет $-12,32$ ккал/моль.



а)

б)

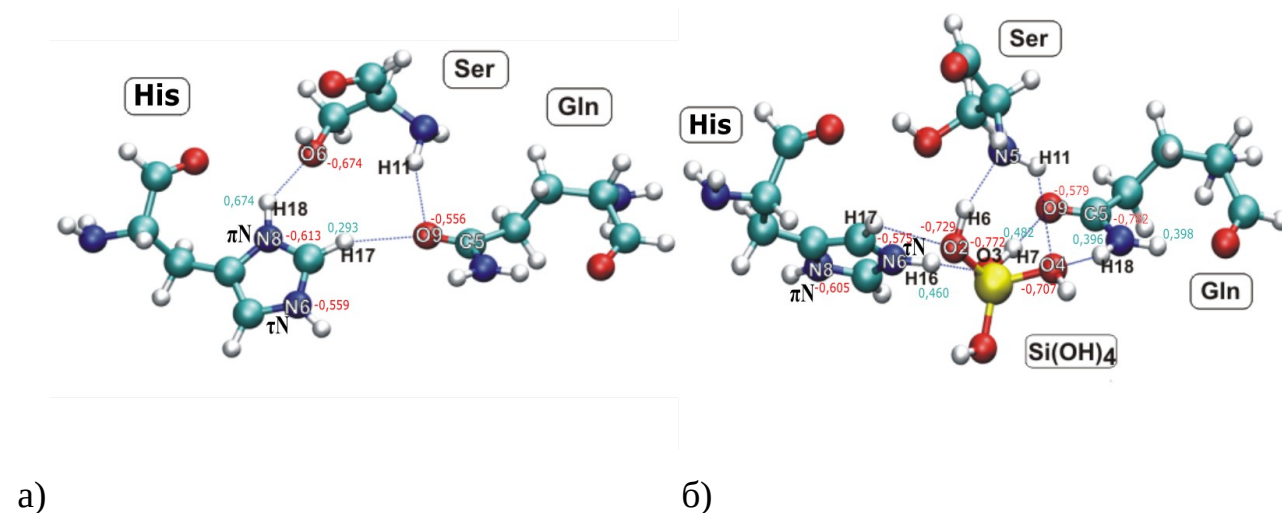
Рисунок 3.6 – Оптимизированная конфигурация активного центра силикатеина- α , с протонированием τ N имидазольного кольца His и расположением τ N кнаружи.

Где, а – каталитическая триада фермента, б – каталитическая триада и субстрат

Состояние 8: протонирование τ N и π N атомов имидазольного кольца His и расположение τ N кнаружи.

Состояние 8 характеризуется полностью протонированной формой имидазольного кольца His (рисунок 3.7). После оптимизации каталитической триады имидазольное кольцо немного разворачивается, в результате чего

формируется две водородные связи: первая между His H₁₈ и O₆ Ser (1,83 Å), вторая между His H₁₇ и O₉ Gln (2,25 Å). При расположении в полости активного центра молекулы Si(OH)₄, с последующей оптимизацией комплекса, образуется большая сеть водородных связей (рисунок 3.7.б).



а)

б)

Рисунок 3.7 – Оптимизированная конфигурация активного центра мутантного фермента 4SER, катепсина-L, с протонированием τN и πN атомов имидазольного кольца His и расположением τN кнаружи. Где, а – каталитическая триада фермента, б – каталитическая триада и субстрат

Шесть водородных связей стабилизируют субстрат, по две на каждый аминокислотный остаток (Приложение Б, таблица 7). Водородная связь His H₁₆ – O₃ Si(OH)₄, длина которой 1,65Å приводит к удлинению на 0,05Å ковалентной связи τN – H₁₆, за счет смещения H⁺ к более электроотрицательному атому (O₃ Si(OH)₄).

3.4 Обсуждение результатов квантово-химических расчетов комплекса каталитическая триада силикатеина-α и Si(OH)₄

В таблице 3.2 суммированы результаты оптимизации каталитической триады с субстратом и без субстрата. Наименьшей энергией связывания обладает полностью депротонированная форма (состояние 1) с энергией связывания в - 32,82 ккал/моль. Для этого варианта характерно 4 водородные связи между каталитическим центром и субстратом. В ходе оптимизации H⁺ от молекулы

H_4SiO_4 переходит на πN , что в дальнейшем может привести к конденсации молекул H_4SiO_4 по основному типу. Для состояний 5 и 3 наблюдается образование пяти водородных связей между каталитической триадой и субстратом, а также незначительное удлинение ковалентной связи у субстрата ($\text{Si}(\text{OH})_3\text{-O-H} \cdots \text{N}_n$) на $0,063\text{\AA}$ и $0,072\text{\AA}$, соответственно. Состояние 6 интересно тем, что поворот имидазольного кольца приводит к формированию пяти водородных связей между каталитической триадой и субстратом, энергия связывания для этого состояния минимальна среди других и составляет $-12,32$ ккал/моль.

Для состояний 2 и 8 комплекса фермента с субстратом образуется цепочка водородных связей, приводящая к небольшому удлинению ковалентных связей. Так в состоянии 2 водородные связи $\text{His } \pi\text{N-H}_{18} \cdots \text{O}_2 \text{ Si}(\text{OH})_4$ и $\text{Si}(\text{OH})_4 \text{ H}_6 \cdots \text{O}_9 \text{ Gln}$, длина которых $1,96\text{\AA}$ и $1,82\text{\AA}$, соответственно. А в состоянии 8 водородные связи выстраиваются следующим образом: $\text{His } \tau\text{N-H}_{16} \cdots \text{O}_3 \text{ Si}(\text{OH})_4$ и $\text{Si}(\text{OH})_4 \text{ H}_7 \cdots \text{O}_9 \text{ Gln}$, длина которых $1,65\text{\AA}$ и $1,61\text{\AA}$, соответственно. Такое расположение приводит к удлинению ковалентной связи $\tau\text{N-H}_{16}$ на $0,05\text{\AA}$, и потенциально, может быть исходной позицией для образования молекулы воды, удерживаемой какое-то время атомом кремния молекулы $\text{Si}(\text{OH})_4$.

Состояния 5 и 6 интересно наличием коротких водородных связей между $\text{His } \tau\text{N} \cdots \text{H-O- Si}(\text{OH})_3$, равных $1,64\text{\AA}$ и $1,81\text{\AA}$, соответственно. Такое расположение может быть исходной позицией переноса H^+ от молекулы $\text{Si}(\text{OH})_4$ на $\tau\text{N His}$.

Для состояния 3 наблюдается последовательность водородных связей, в которую вовлечена гидроксильная группа Ser: $\text{His } \pi\text{N} \cdots \text{H}_{13} \text{ Ser}$ и $\text{O}_6 \text{ Ser} \cdots \text{H}_7 \text{ Si}(\text{OH})_4$, длина которых $1,75\text{\AA}$ и $1,82\text{\AA}$, соответственно. По данной стартовой конфигурации комплекса можно предположить последовательный переход протона гидроксила Ser на $\pi\text{N His}$, что в свою очередь приведет к переносу протона с $\text{Si}(\text{OH})_4$ на Ser. В результате кислород может совершить нуклеофильную атаку на атом кремния другой молекулы ортокремниевой кислоты.

Таблица 3.2 – Сводная таблица по 8 конформационным состояниям каталитической триады силикатеина- α

№	Модель структуры	Протонирование	E, ккал/моль	K _p	Парциальные заряды		Парциальные заряды с Si(OH) ₄	
					π N	τ N	π N	τ N
1		нет	-32,82	$2,681 \cdot 10^{24}$	-0,522	-0,502	-0,624	-0,459
2		π N	-26,69	$7,339 \cdot 10^{19}$	-0,635	-0,427	-0,631	-0,434
3		τ N	-28,15	$8,961 \cdot 10^{20}$	-0,476	-0,569	-0,561	-0,561
4		τ N, π N	-25,94	$2,029 \cdot 10^{19}$				
5		нет	-26,78	$8,564 \cdot 10^{19}$	-0,525	-0,50	-0,54	-0,512
6		π N	-12,32	$2,11 \cdot 10^{12}$	-0,611	-0,480	-0,606	-0,488
7		τ N	-16,53	$1,479 \cdot 10^9$	-0,482	-0,527	-0,572	-0,595
8		τ N, π N	-21,92	$2,067 \cdot 10^{16}$	-0,613	-0,559	-0,605	-0,575

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

В целом, протонированная форма азота имидазольного кольца His имеет больший (по модулю) парциальный заряд. В случае равного протонирования атомов τ N и π N, последний является более электроотрицательным атомом. Данное соотношение характерно как для свободного активного центра, так и в комплексе с Si(OH)₄ (таблица 3.9). Следует также отметить, что на ППЭ переноса H⁺ оказывают влияние аминокислотные остатки, не включенные в модель активного

центра. Так присутствие Asp187 может понизить кислотность гистидина. Возможно, что предложенный ранее механизм (Zhou et al., 1999, Schröder et al., 2012) недостаточно точно описывает действительную картину, и в процессе катализа активное участие принимают другие аминокислоты. В частности, не исключена возможность согласованного (концертного) переноса протона на лN атом азота имидазольного кольца с одновременным переносом протона с тN азота имидазольного кольца на какой-либо другой аминокислотный остаток.

3.5 Поверхность потенциальной энергии переноса H^+ в пределах электроотрицательной пары атомов аминокислотных остатков каталитической триады силикатеина- α и молекулы $Si(OH)_4$

По данным оптимизации комплекса каталитической триады с молекулой $Si(OH)_4$ можно выделить конфигурации активного центра, которые потенциально могут запускать активацию молекулы кремниевой кислоты и процесс конденсации. Такими стартовыми конфигурациями могут выступать все рассмотренные состояния, за исключением четвертого, в котором происходит поворот имидазольного кольца His и переход его в состояние, близкое к восьмому. Полученные конфигурации можно разделить на группы по аминокислотным остаткам, которые могут инициировать активацию $Si(OH)_4$.

Первая группа – группа серина, характерна для состояния три. Вторая группа – группа гистидина. Последнюю можно разделить на две подгруппы: протонированный азот His является потенциальным донором протона (состояние два и семь) и депротонированный азот His может выступать в роли акцептора протона (состояние пять и шесть). Для каждого из вариантов построена поверхность потенциальной энергии (ППЭ) переноса протона в пределах электроотрицательных атомов водородной связи, рассчитаны энергетические барьеры и энергетические минимумы системы.

В геометрии состояния 2 (протонированный лN имидазольного кольца, лN расположен снаружи) после оптимизации расстояние между

электроотрицательными атомами His пN и O₂ Si(OH)₄ составило 2,79Å. ППЭ перемещения протона (рисунок 3.10, черным цветом) была получена путем генерации восьми позиций расположения протона (His H₁₈), вдоль вектора пN → O₂. Расчет каждой позиции проводился согласно вышеописанному протоколу (раздел 2.2.5). Энергии представлены относительно позиции с минимальной энергией.

При расчете системы с использованием модели РСМ на ППЭ присутствует два минимума, разделяемых энергетическим барьером. Первый минимум расположен в области 1,1Å от пN His, второй на расстоянии 0,98Å от O₂ Si(OH)₄. Энергетический барьер перемещения протона от пN His к O₂ Si(OH)₄ составляет 14,2 ккал/моль, в то время как энергетический барьер обратной реакции низок и составляет лишь 1,7 ккал/моль. При этом общая энергия системы при расположении перемещаемого H⁺ вблизи O₂ Si(OH)₄ составляет на 12,5 ккал/моль больше, чем расположение H⁺ вблизи пN His. Наличие второго минимума энергии системы, вблизи O₂ Si(OH)₄, говорит о том, что существует определенная вероятность нахождения там H⁺. Однако низкий барьер обратной реакции позволит H⁺ с легкостью вернуться к пN His.

Для состояния 7 (протонированный тN имидазольного кольца His, тN расположен снаружи) расстояние между электроотрицательными атомами His тN и O₂ Si(OH)₄ составило 2,92Å. ППЭ перемещения H⁺ (рисунок 4.7, серым цветом) была получена путем генерации одиннадцати позиций расположения H⁺ (His H₁₆), вдоль вектора тN → O₂. В системе присутствует один общий минимум, положения H⁺, на расстоянии в 0,96Å от тN His. Минимум вблизи O₂ Si(OH)₄ не образуется ни при расчете в вакууме, ни с использованием расчетов в РСМ.

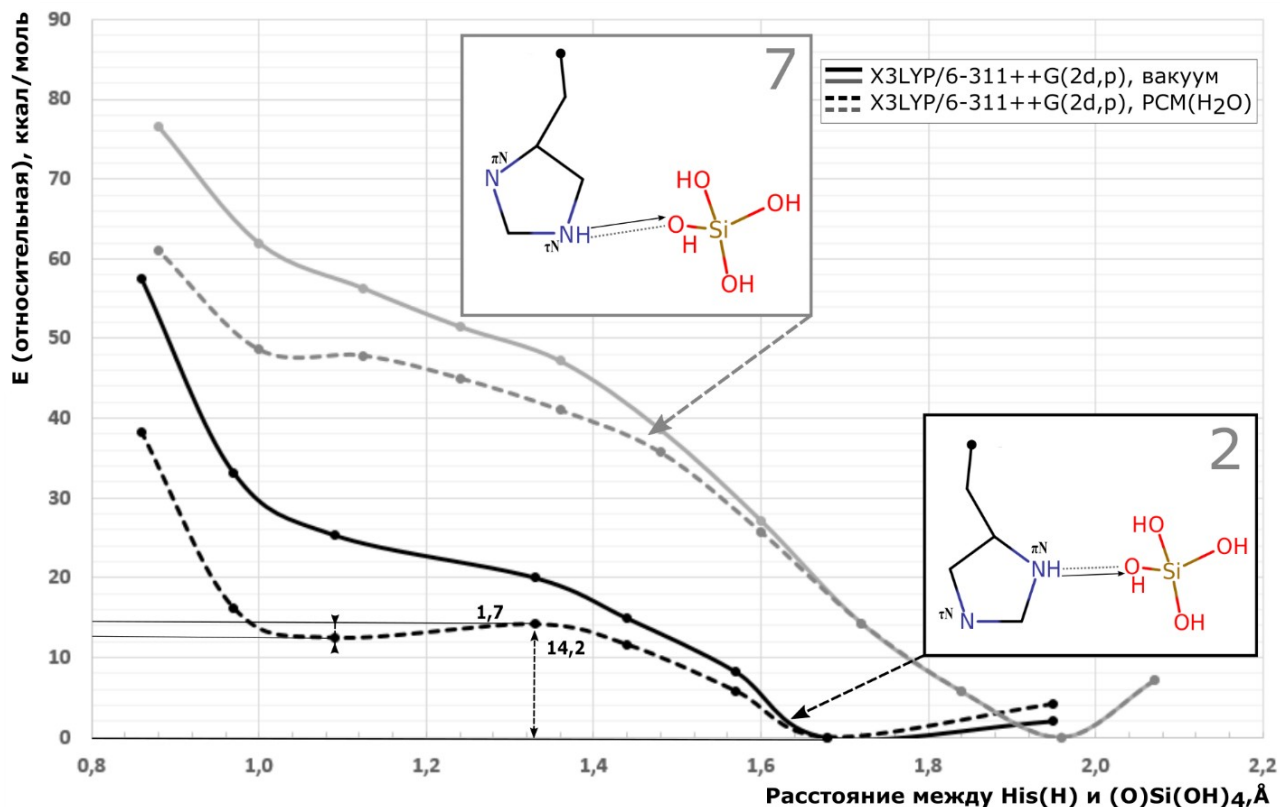


Рисунок 3.10 – Квантово-химические расчеты ППЭ переноса H^+ между электроотрицательной парой атомов His N и O Si(OH)₄, методом X3LYP/6-311⁺G(2d, p) в вакууме и с учетом модели неявного растворителя (PCM (H₂O)), где атом N-His выступает потенциальным донором H^+ , по оси ординат показаны относительные энергии (относительно системы с минимальной энергией)

Для состояний 5 и 6 построена ППЭ переноса H^+ от O Si(OH)₄ на tN имидазольного кольца His (рисунок 3.11). ППЭ состояния 5 при пересчете с учетом мнимого растворителя имеет 2 минимума, соединенных энергетическим барьером прямой реакции 4,36 ккал/моль и обратной 3,23 ккал/моль. Разница в энергиях между двумя локальными минимумами составляет 1,13 ккал/моль, что может быть отнесено к погрешности метода. Учитывая, что полностью депротонированная форма имидазольного кольца His обычно не встречается, то можно предположить, что вероятность нахождения H^+ Si(OH)₄ на расстоянии длины связи от tN His является возможной.

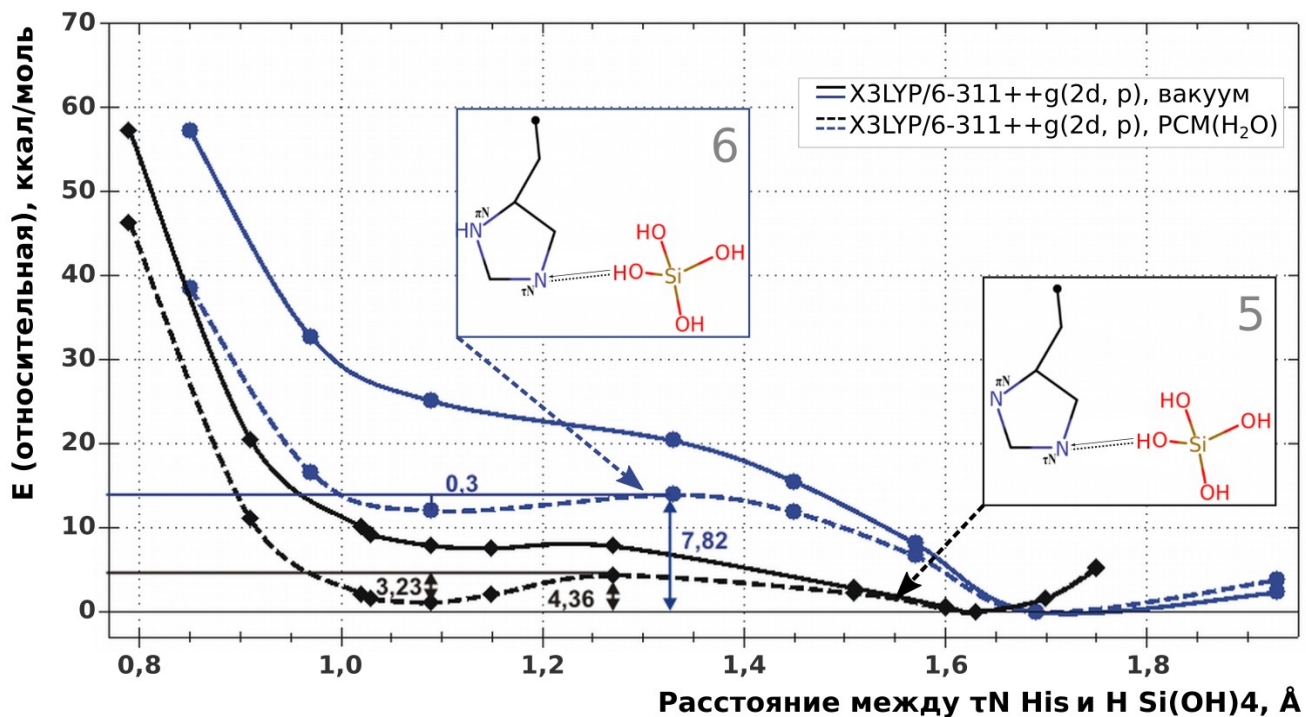


Рисунок 3.11 – Квантово-химические расчеты ППЭ переноса H^+ между электроотрицательной парой атомов O $Si(OH)_4$ и tN His, методом X3LYP/6-311⁺G(2d, p) в вакууме и с учетом модели неявного растворителя PCM, по оси ординат показаны относительные энергии (относительно системы с минимальной энергией)

ППЭ состояния 5 при пересчете с учетом мнимого растворителя имеет 2 минимума, соединенных энергетическим барьером прямой реакции 4,36 ккал/моль и обратной 3,23 ккал/моль. Разница в энергиях между двумя локальными минимумами составляет 1,13 ккал/моль, что может быть отнесено к погрешности метода. Учитывая, что полностью депротонированная форма имидазольного кольца His обычно не встречается, то можно предположить, что вероятность нахождения H^+ $Si(OH)_4$ на расстоянии длины связи от tN His является возможной.

ППЭ состояния 6 при пересчете с учетом мнимого растворителя имеет 2 минимума энергии: первый на расстоянии 0,98Å от O $Si(OH)_4$, второй на расстоянии 1,15Å, от tN His. Энергетический барьер прямой реакции переноса H^+

составляет 7,82 ккал/моль, энергетический барьер обратной - 0,3 ккал/моль. Низкий барьер обратной реакции позволит H^+ с легкостью вернуться к $O-Si(OH)_4$.

На основании рассмотренных профилей ППЭ переноса H^+ потенциальными состояниями, в которых возможен начальный этап активации молекулы ортокремниевой кислоты, могут быть состояния 2 и 6, хотя оба характеризуются низким энергетическим барьером для обратной реакции. Кроме того, состояние 1 и 5 могут потенциально являться начальной стадией активации кремниевых кислот, однако при нейтральном значении pH они маловероятны (Zhang *et al.*, 2020). Однако такой вариант может быть возможным, если рассматривать эти формы как короткоживущие интермедиаты, которые работают как части челночных систем переноса H^+ подобно классическому механизму работы сериновых протеаз (Blow *et al.*, 1969; Fodor *et al.*, 2006).

ГЛАВА 4. ОБЛАСТИ СВЯЗЫВАНИЯ СИЛИКАТЕИНА-А С КРЕМНИЕВЫМИ КИСЛОТАМИ

4.1 Определение олигомерного разнообразия кремниевых кислот в водном растворе методом МД

4.1.1 Количественная оценка образования олигомеров кремниевых кислот

Природными субстратами для фермента силикатеина- α являются кремниевые кислоты, растворенные в водном растворе. Вопрос олигомерного состава и изомерного разнообразия до сих пор остается открытым (Sjöberg *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 2006; Knight *et al.*, 2007; Butler *et al.*, 2012; Vorba *et al.*, 2017). В работе проводился поиск олигомерного разнообразия природных субстратов для фермента силикатеина- α , для этого методом МД в реализованном реакционном силовом поле FG (Fueston and Garofalini, 1990) была сформирована траектория динамики образования кремниевых кислот (2.3.2.1).

Для олигомеров с длиной цепочки $Si_n=1-8$ на каждом шаге МД рассчитывалась их доля по отношению к начальному числу молекул ортокремниевой кислоты, на основании которой были получены функция тренда изменения колебаний, коэффициент наклона прямой и среднее квадратичное отклонение (СКО) (рисунок 4.1). Таблица 1 в приложении В представляет результаты для олигомеров с длиной цепочки до $Si_n=9$ (система45) и до 16 (система56). Анализ изменения доли классов олигомеров в МД показывает, что первые 0,5 нс динамики приводят к резкому увеличению количества небольших олигомеров. В дальнейшем их концентрация начинает плавно уменьшаться в течение всей траектории в обеих системах. Временем отсчета изменений поведения системы выбрано 0,5 нс от начала динамики. Доля молекул ортокремниевой кислоты в системе45 к 0,5 нс МД снижается до 0,6, а для системы56 – до 0,52. При этом коэффициент наклона линии тренда в системе45

составляет $-0,048$, а для системы 56 равен $-0,333$, то есть с течением времени количество исходных мономеров уменьшается с большей скоростью в системе 56.

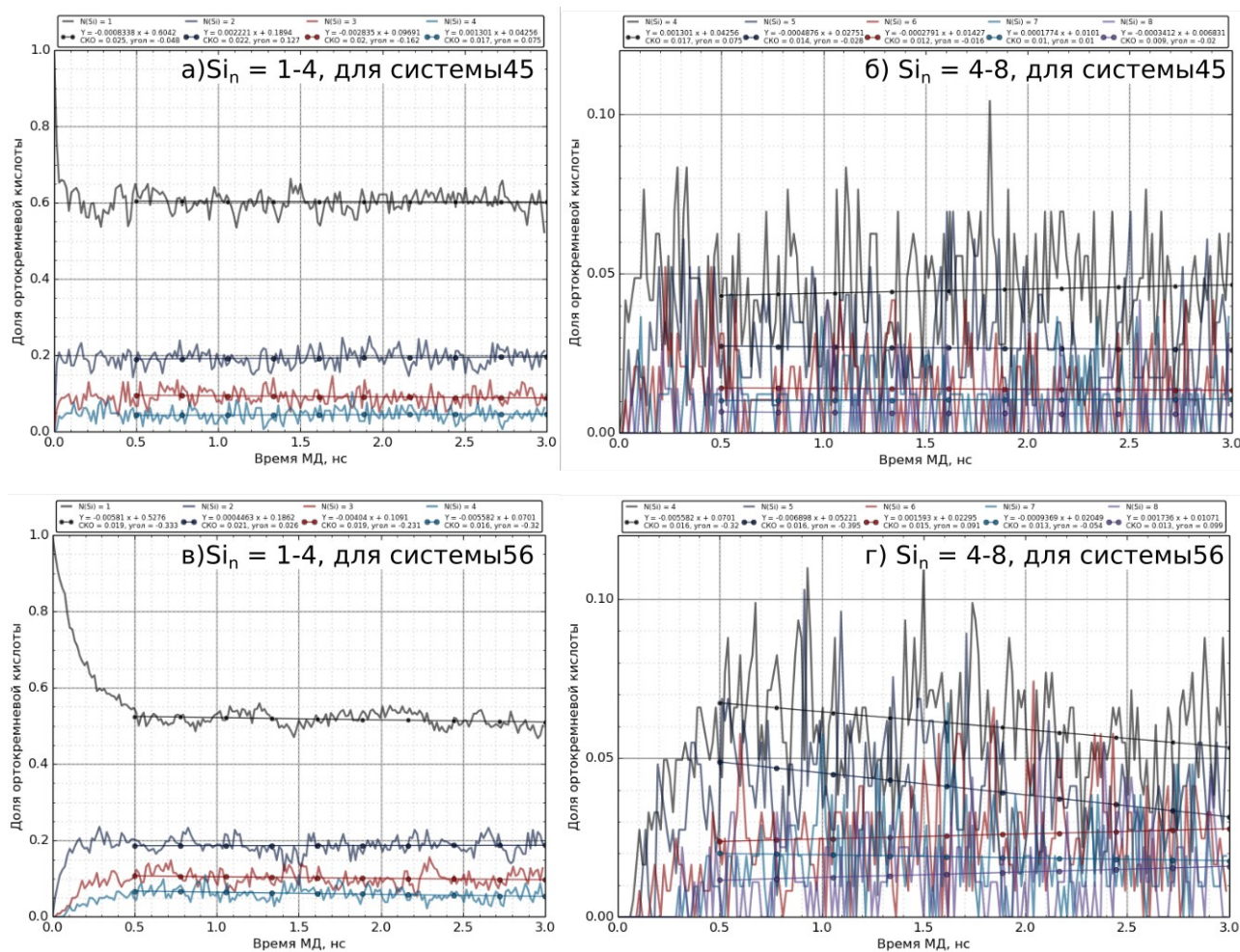


Рисунок 4.1 — Зависимость доли олигомеров кремниевых кислот с длиной цепочки от $Si_n=1-8$, в течение 3 нс: а) $Si_n=1-4$ для системы 45; б) $Si_n=4-8$ для системы 45; в) $Si_n=1-4$ для системы 56; г) $Si_n=4-8$ для системы 56

В обеих системах доля димеров в ходе МД практически не изменяется и остается достаточно высокой на всем протяжении МД. Для системы 45 доля димеров колеблется около $\sim 0,6$, в для системы 56 около $\sim 0,525$. В системе 45 в ходе МД наблюдается уменьшение доли тримеров и медленный рост количества олигомеров $Si_n=4-9$ (на рисунке 1, б представлены $n = 4-8$). В системе 56 после резкого образования олигомеров $Si_n=3-5$ наблюдается медленный их спад и рост числа структур с количеством атомов кремния от 6 до 16 (на рисунке 3.1, г

представлены $n = 4-8$). Олигомеры большей длины (для системы 45 больше 9 и для системы 56 больше 16) единичны.

Общий профиль изменения долей рассмотренных олигомеров кремниевых кислот сопоставим с результатами спектроскопии ЯМР²⁹Si и спектроскопии УФ-комбинационного рассеяния (Rao and Gelb, 2011). Такая же картина динамики изменения долей образующихся кремниевых кислот была получена при проведении широкомасштабного моделирования олигомеризации кремниевых кислот при нейтральном значении pH (Rao and Gelb, 2004). Авторы данных работ (Rao and Gelb, 2004, Depla *et al.*, 2011) высказывают предположение, что именно димеры на этом временном промежутке играют ключевую роль в олигомеризации.

Стоит отметить, что при сравнении экспериментально полученных данных с результатами моделирования необходимо учитывать, что в качестве образцов при исследовании процессов олигомеризации кремниевых кислот зачастую используются соли тетраэтоксисилана, органодиалкоксисилана или диорганодиалкоксисилана (Verstraelen *et al.*, 2009; Rao and Gelb, 2004; Depla *et al.*, 2011). Диссоциация в растворах Na⁺ или K⁺ солей может приводить к изменениям ионной силы раствора, при этом, как показано в работе (Verstraelen *et al.*, 2009), концентрация NaCl влияет на олигомерное разнообразие в системе. В диапазоне концентрации NaCl от 0,001 до 1 М наблюдается преобладание доли димеров, однако, при дальнейшем повышении концентрации NaCl в растворе начинается рост доли тримеров, тетрамеров и пентамеров с постепенным снижением доли димеров (Verstraelen *et al.*, 2009, Depla *et al.*, 2011). Поэтому отмеченное во многих экспериментальных работах снижение (Issa *et al.*, 2020) доли димеров со временем эксперимента может быть связано в первую очередь с наличием в растворах свободных ионов.

Поскольку в рамках настоящего моделирования в системе отсутствовали свободные ионы, наблюдаемое постоянное значение доли димеров вполне предсказуемо и согласуется с экспериментальными данными, также полученными в отсутствие влияния данного фактора (Tanaka *et al.*, 2000; Rao and Gelb, 2004,

Derla *et al.*, 2011). За весь период МД кремниевых кислот в водном растворе обнаружены структуры с длиной цепочки до 20 (система45) и 27 атомов кремния (система56) (рис. 4.2).

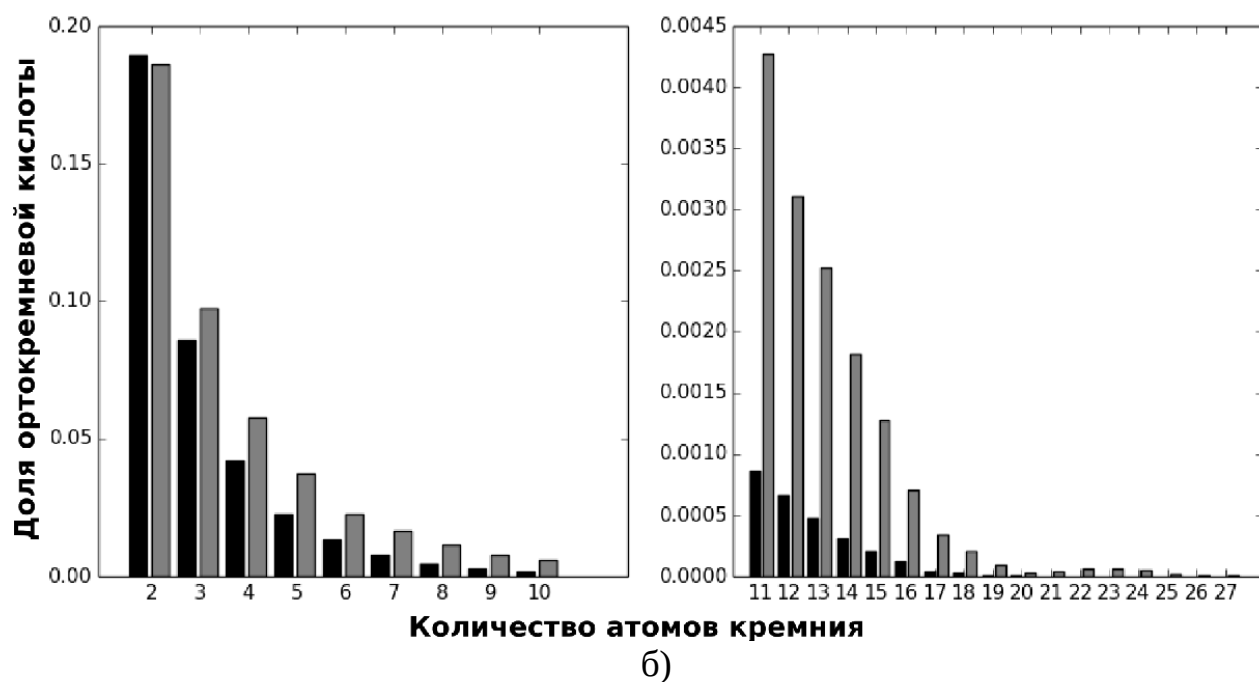


Рисунок 4.2 - Распределение олигомеров с длиной цепи $Si_n = 2-27$ за Знс МД. а) - распределение $Si_n = 2-10$, б) - $Si_n = 11-27$. Черным цветом для системы45 и серым для системы56, соответственно

Большая доля кремниевых кислот приходится на небольшие олигомеры до 9 (система45) и до 16 атомов кремния (система56). Олигомеры с максимальной длиной цепочки единичны и присутствуют на последних шагах МД. Основываясь на том, что с течением времени происходит укрупнение олигомеров, и силовое поле включает геометрические параметры кристаллической решетки кварцевого стекла (Feuston and Garofalini, 1990), можно предположить, что увеличение времени динамики приведет к получению фрагментов кварцеподобных структур и позволит выявить на молекулярном уровне этапы их формирования.

4.1.2 Пространственная изомерия кремниевых кислот

Было проведено изучение разнообразия геометрических изомеров, образующихся в ходе МД олигомеров, и подсчет наиболее высокочастотных

вариантов. На рисунке 4.3 приведены наиболее часто встречающиеся структуры, ранжированные в соответствии с частотой их образования. За единицу принято количество высокочастотного линейного тримера (3L), остальные варианты изомеров представлены относительно него. Доминирующее место занимают линейные и разветвленные структуры, среди двадцати наиболее часто встречаемых изомеров отсутствуют циклические формы. Картина распределения первых 9 олигомеров сопоставима для обеих систем.

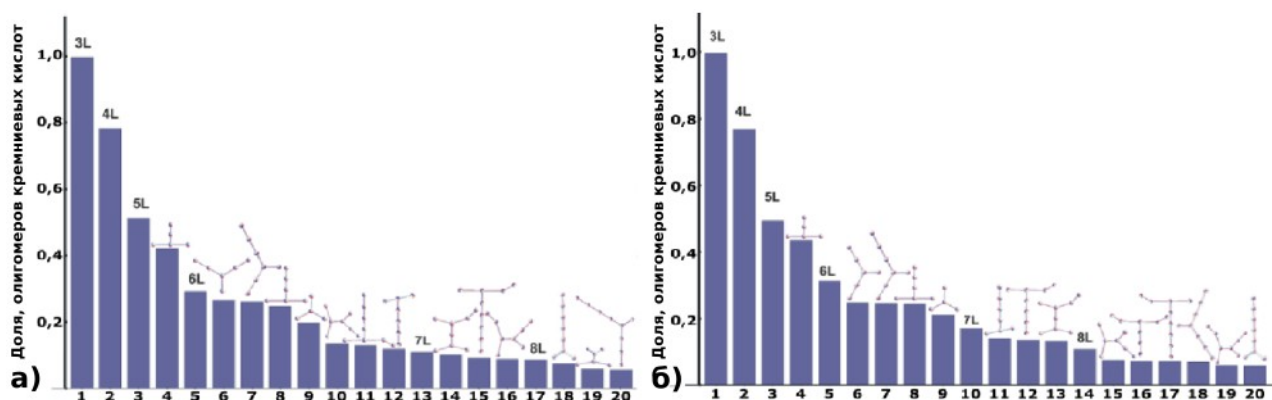


Рисунок 4.3 — Двадцать наиболее высокочастотных графовых форм пространственных изомеров кремниевых кислот: а — система45; б — система56.

За 1 принята доля графовой формы линейного тримера

Отдельным вопросом является наличие среди образовавшихся олигомеров циклических форм. По результатам проведенной динамики циклические формы в системе присутствуют в низком процентном соотношении, не превышающем 0,01%. Циклические формы определены для олигомеров с числом атомов кремния 3-6, циклические олигомеры с большим числом атомов не зафиксированы (рисунок 4.4).

Форма олигомеров сильно зависит от условий среды, в которой происходит эксперимент. Так согласно данным литературы, повышение давления до 0,9 ГПа приводит к уменьшению количества циклических форм, в то время как присутствие ионов аммония и их производных (Chen *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2011), а также катионов тетраалкиламмония (ТАА) и тетраметиламмония (ТМА) (Knight *et al.*, 1989) приводит к возрастанию доли циклических форм.

Предпочтительное образование линейных и разветвленных форм наблюдается при нейтральном и сильно кислом pH (Lazaro *et al.*, 2017). Напротив, использование насыщенных щелочных растворов приводит к преобладанию плоских и объемных циклических форм (Depla *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2019; Lazaro *et al.*, 2017; Pilgrim *et al.*, 2018).

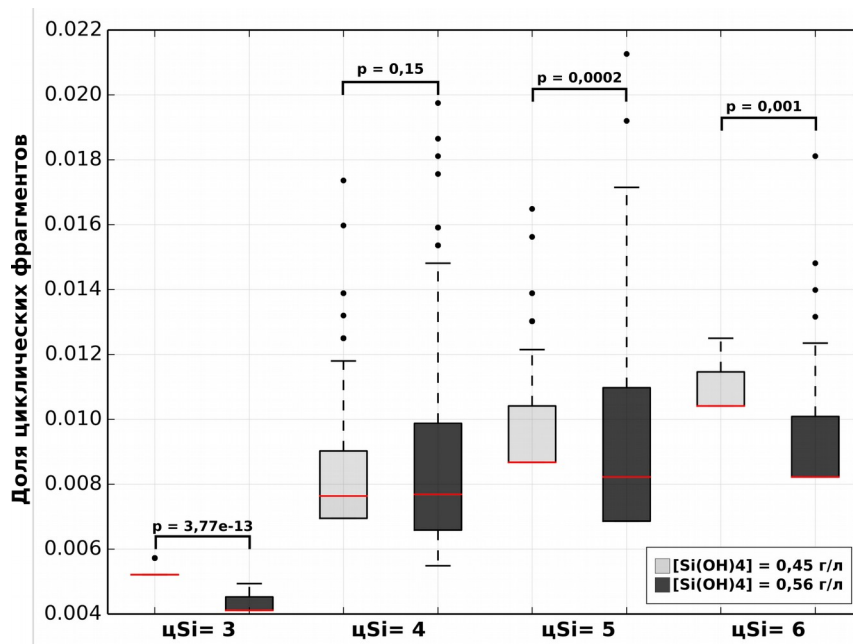
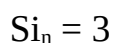


Рисунок 4.4 — Доля циклических фрагментов среди олигомерного разнообразия кремниевых кислот, с числом атомов $Si_n = 3-6$, где красным — медиана, усы — 95% доверительный интервал

Поскольку при проведении моделирования pH системы соответствует нейтральному значению, доминирование линейных и разветвленных форм является предсказуемым. Такое же распределение было получено в квантово-химических исследованиях, проведенных методом DFT в базисном наборе B3LYP/6-311+G(d,p) (Vorba *et al.*, 2017).

Далее рассмотрим отдельно структуры, содержащие различное количество атомов кремния.



Для структур, содержащих три атома кремния, возможно образование лишь двух изомеров – линейного и циклического (рис. 4.5, а). Оба обсуждаемых изомера идентифицированы экспериментально: методом ЯМР ^{29}Si (Cho *et al.*,

2006; Vorba *et al.*, 2017). За весь период МД в системе56 было отмечено присутствие 40328 тримеров, из которых лишь 101 (0,25%) – циклические. И в системе56 из 32670 идентифицированных тримеров лишь 60 (0,18%) присутствовали в циклической форме. Согласно результатам DFT, наиболее стабильной является линейная конформация, энергия образования которой превышает на 16,9 ккал/моль энергию циклической структуры (Pilgrim *et al.*, 2018), что подтверждается и в экспериментальных исследованиях с использованием спектроскопии ЯМР ^{29}Si (Tanaka *et al.*, 2000, Rimsza *et al.*, 2018).

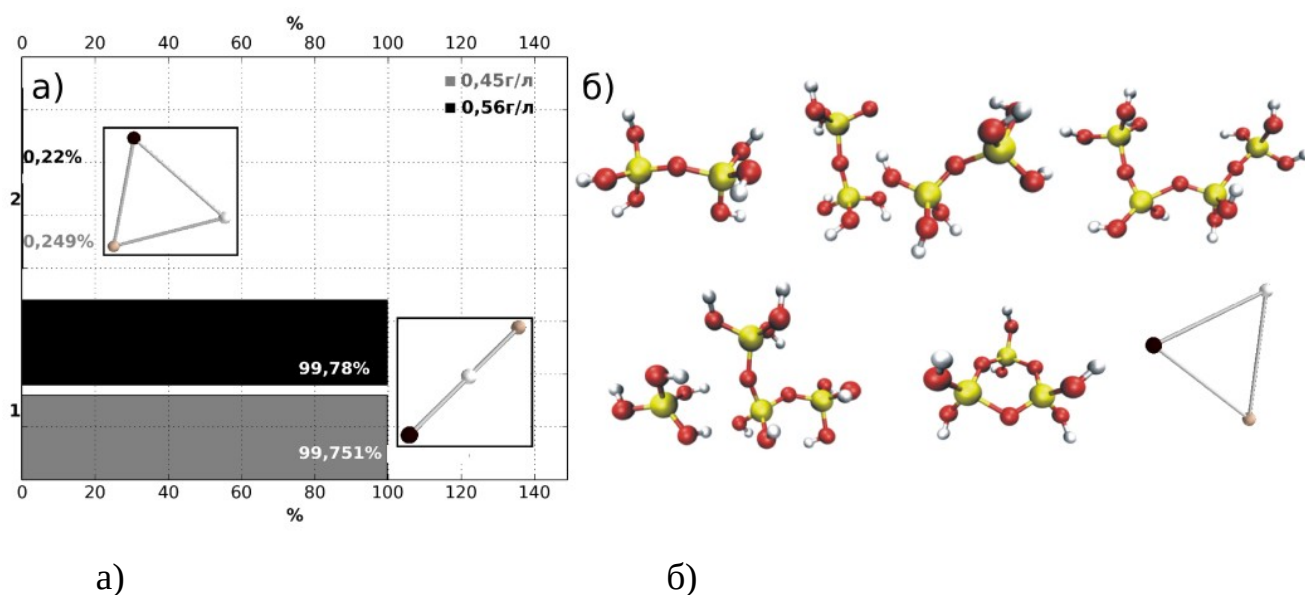


Рисунок 4.5 — Графовые представления структур кремниевых кислот, содержащих $\text{Si}_n=3$, где а - распределение пространственных изомеров кремниевых кислот, б - поэтапный механизм образования циклического тримера

Несмотря на низкую частоту встречаемости в насыщенных нейтральных водных растворах (Cho *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2000; Vorba *et al.*, 2017), циклический тример рассматривается как потенциальный строительный блок для образования спикул при формировании кремниевого экзоскелета губок родов *Demosponge* и *Hexactinellid* (Schröder *et al.*, 2016).

В настоящее время нет однозначного представления о порядке реакций образования циклического тримера. В некоторых работах высказывается предположение, что образование данного олигомера происходит через

последовательное удлинение цепи до трех звеньев, завершающееся образованием цикла и выделением одной молекулы воды (Schröder *et al.*, 2016; Belton *et al.*, 2012).

При использовании силового поля FG одна из схем построения циклического тримера подразумевает участие двух димеров, конденсация которых приводит к образованию тетрамера (рис. 4.5, б). На завершающем этапе к центру тетрамера подходит один мономер, цепочка изгибается с отделением крайнего тетраэдра ортокремниевой кислоты, и оставшиеся три мономера цепочки замыкаются в цикл. Представленный профиль изменения долей олигомеров с разным количеством атомов Si (рисунок 4.1) косвенно подтверждает предложенный механизм, в основе которого лежит присутствие в системе достаточно высокой доли димеров на всей траектории МД, что также было отмечено и работах (Tanaka *et al.*, 2000; Rao and Gelb, 2004; Depla *et al.*, 2011).

Следует заметить, что метод МД не позволяет однозначно определить предпочтительный механизм образования циклических тримеров. Однако дополнительное исследование с использованием квантово-химических методов построения энергетических профилей промежуточных реакций, включающих расчет основных и переходных состояний, а также расчет энергетических барьеров дадут возможность понять детали этого механизма.

$$Si_n = 4$$

Среди тетрамеров в ходе динамики обнаружено пять видов изомеров, существование всех подтверждено экспериментально (Cho *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2019; Sjoberg *et al.*, 1996) (рисунок 4.6, а). Распределение долей каждого вида изомеров сопоставимо в обеих исследуемых системах. Подавляющее большинство структур представлено линейным тетрамером, доля которого составляет 76–77% от общего количества тетрамеров, образовавшихся в ходе МД. Разветвленные тетрамеры образуются в 20–22%, циклический тетрамер в 2%, менее 0,1–0,2% приходится на однозамещенный циклический тример.

Бициклический тетрамер представлен единичным случаем. Схема образования бициклического тетрамера начинается с линейного тримера и димера, объединение которых приводит к линейному пентамеру (рисунок 3.6, б). Пентамер через присоединение одного мономера становится разветвленным. Пространственное сближение четвертого и второго атомов кремния, а также расположение пятого и первого атомов кремния по разные стороны от "плоскости" приводит к промежуточной форме. Образование силоксановой связи между четвертым и вторым атомами кремния позволяет образоваться бициклическому тетрамеру при отделении двух мономеров (атомы Si 1 и 6, рисунок 4.6, б).

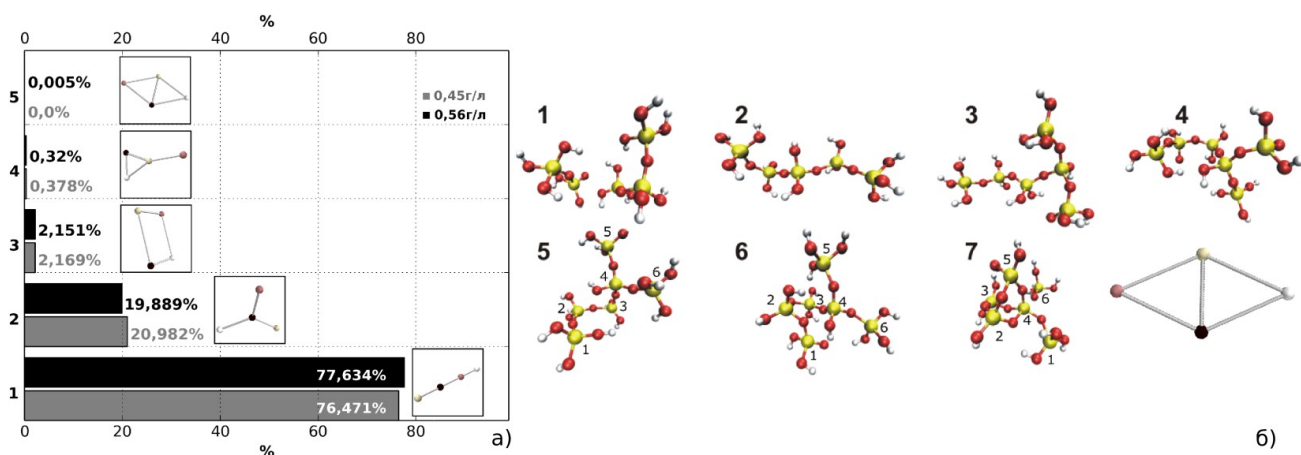


Рисунок 4.6 - Графовые представления структур кремниевых кислот, содержащих $Si_n=4$, где: а - распределение пространственных изомеров тетрамеров кремниевых кислот, б - поэтапный механизм образования бициклического тетрамера

Согласно расчетным данным (Catlow *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 1998) линейный тетрамер является предпочтительной конфигурацией (его энергия конденсации составляет $-38,2$ ккал/моль), далее следует разветвленный тетрамер ($-30,6$ ккал/моль), циклический тетрамер ($-12,5$ ккал/моль), затем однозамещенный циклический тетрамер ($-6,0$ ккал/моль). Несмотря на то, что бициклический тетрамер в работах (Pereira *et al.*, 1998; Catlow *et al.*, 1998) не рассматривался, данный изомер был обнаружен методом ЯМР ^{29}Si (Cho *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2000). Таким образом, полученные результаты качественно

согласуются как с квантово-химическими расчетами, так и с экспериментальными данными.

$$Si_n = 5$$

В ходе симуляции МД обнаружено 7092 пентамеров для системы 45 и 12267 для системы 56. Среди всех пространственных изомеров обнаружено 10 различных видов, содержащих в составе 5 атомов Si (рис. 4.7, а). Восемь из десяти обнаруженных нами пентамеров описаны в растворах силикатов на начальном этапе полимеризации методом ЯМР ^{29}Si (Cho *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2000). На долю линейной (1, рисунок 4.7, а) и двух разветвленных форм (2 и 4, рисунок 3.7, а) приходится большая часть образовавшихся пентамеров: $\sim 93,83\%$ и $\sim 94,23\%$ для системы 45 и системы 56, соответственно.

Ab initio расчеты относительной энергии образования каждого олигомера методом DFT (Belton *et al.*, 2012) позволяют их расположить по возрастанию энергии следующим образом: $Q^1_2Q^2_3 - 1$, разветвленный пентамер ($Q^1_3Q^2_1Q^3_1$) – 2, крестообразная структура ($Q^1_4Q^4_1$) – 4, циклическая форма (Q^2_5) – 5 и $Q^1_2Q^3_1Q^2_3 - 6$. Однако энергия $Q^1_1Q^2_3Q^3_1 - 7$ больше, чем энергия $Q^1_4Q^4_1 - 4$ (на 1 ккал/моль или на 5 ккал/моль после применения авторами эмпирической поправки). Как отмечают сами авторы, такая разница в энергии находится в пределах ошибки используемого метода (Belton *et al.*, 2012).

Олигомер $Q^1_2Q^2_2Q^4_1$ (9/10 рис. 4.7, а) ранее не был описан ни экспериментальными, ни вычислительными методами (Cho *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2000; Lazaro *et al.*, 2017; Vorba *et al.*, 2017; Belton *et al.*, 2012) и представлен впервые. Общая схема формирования $Q^1_2Q^2_2Q^4_1$ схематично изображена на рисунке 4.7, б и состоит из следующих этапов: удлинение димера до линейного тетрамера, образование точки ветвления путем присоединения одного мономера. Такая конфигурация соответствует высокочастотному разветвленному олигомеру 2 (рисунок 3.7,а). Дальнейшее замыкание в цикл линейного тримерного фрагмента дает низкочастотный изомер $Q^1_2Q^2_2Q^4_1$ (9/10 рис. 4.7,а).

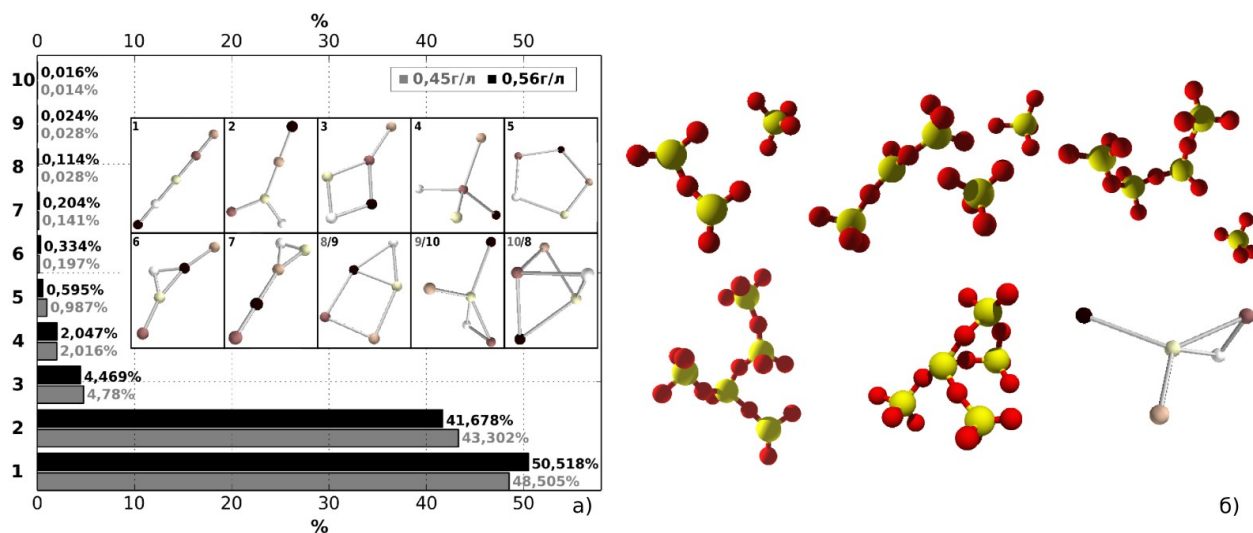


Рисунок 4.7 - Графовые представления структур кремниевых кислот, содержащих $Si_n=5$, где а - распределение пространственных изомеров, б - поэтапный механизм образования $Q^1_2Q^2_2Q^4_1$ (9/10)

$$Si_n = 6$$

За 3 нс МД образовалось 3721 (система45) и 6996 (система56) молекул с $Si_n=6$, среди которых можно выделить 29 и 27 уникальных пространственных изомеров, соответственно.

Количественное распределение по встречаемости долей первых двадцати гексамеров приведено на рисунок 4.8. Характер распределения 10 наиболее часто встречаемых изомеров сходен в обеих системах. Изомеры, содержащие циклические фрагменты, представлены достаточно широко, однако количественно доминируют линейные и разветвленные формы, доли которых составляют 89,57% и 87,6% для системы45 и системы56, соответственно.

Среди высокочастотных структур в общей сложности методом ЯМР ^{29}Si и масс-спектрометрией с бомбардировкой быстрыми атомами идентифицировано лишь 10 изомеров (Cho *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2000; Lazaro *et al.*, 2017; Borba *et al.*, 2017; Sjoberg *et al.*, 1996). Восемь изомеров встречаются в системе45: $Q^1_2Q^2_4-1$, $Q^1_4Q^3_2-4$, $Q^1_1Q^2_4Q^3_1-7$, $Q^1_2Q^2_2Q^3_2a-8$, $Q^1_2Q^2_2Q^3_2b-9$, Q^2_6-12 , $Q^2_4Q^3_2a-15$, $Q^1_3Q^3_3-16$ и девять изомеров в системе56: $Q^1_2Q^2_4-1$, $Q^1_4Q^3_2-4$, $Q^1_1Q^2_4Q^3_1-6$, $Q^1_2Q^2_2Q^3_2a-7$,

$Q^1_2Q^2_2Q^3_2b-$ 8, $Q^2_4Q^3_2a-$ 11, Q^2_6- 12, $Q^2_4Q^3_2b-$ 13, $Q^1_1Q^2_2Q^3_3-$ 19 (Cho *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2000; Lazaro *et al.*, 2017; Borba *et al.*, 2017; Sjoberg *et al.*, 1996).

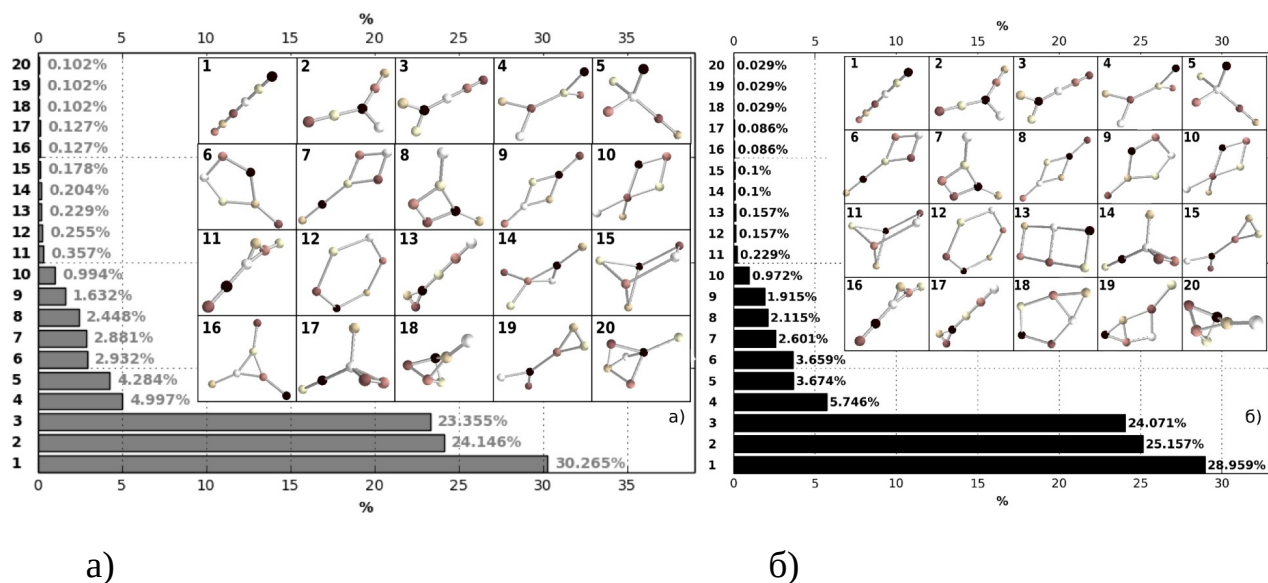


Рисунок 4.8 - Графовые представления структур кремниевых кислот, содержащих $Si_n=6$, где а - система45, б - система56

$Si_n = 7$

За весь период МД образовалось 2044 и 4223 олигомеров с длиной цепочки $Si_n=7$ в системе45 и системе56, соответственно. Для системы45 удалось выделить 49 уникальных пространственных изомеров, среди которых 18 форм представлены в единственном варианте. Для системы56 – 59 изомеров, среди которых 16 форм являются единичными (рисунок 4.9). Следует отметить, что идентификация методом ЯМР ^{29}Si олигомеров большего размера затруднена из-за собственных ограничений метода (Borba *et al.*, 2017).

По литературным данным методом ЯМР ^{29}Si идентифицировано лишь 13 пространственных изомеров (Cho *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2000; Lazaro *et al.*, 2017; Borba *et al.*, 2017; Sjoberg *et al.*, 1996), из них нами было обнаружено 4 изомера, это $Q^1_3Q^2_1Q^3_3-$ 10, в системе45 (рисунок 4.9,а) и $Q^1_4Q^3_1Q^4_1-$ 16, в системе45 и 13 в системе56, а также $Q^1_1Q^2_4Q^3_2a-$ 21 и $Q^1_1Q^2_4Q^3_2b-$ 22 в системе56 (рисунок 4.9, в), относящиеся к единичным формам (0,0054% и 0,0014%).

В строении больших олигомеров присутствуют фрагменты структур меньших олигомеров. Среди них: Q^2_3 ; Q^2_4 ; фрагмент $Q^1_3Q^3_1$ (5, рисунок 4.8, а) – трехзамещенный мономер (олигомер представлен в ~5% случаях); Q^3_4 (23, рисунок 4.9, в) не встречаемый среди тетрамеров в данной траектории МД, однако данный фрагмент подтвержден экспериментально; трехзамещенный тример 24 на рисунке 4.9, в содержит фрагмент гексамера $Q^1_3Q^3_3$, который также подтвержден экспериментально и идентифицирован среди $Si_n=6$ (олигомер представлен в 0,052%); $Q^2_3Q^3_2a$ – бициклический пентамер (8 для системы45); 2 структуры $Q^2_3Q^3_4$ (25, рисунок 4.9, в) – его ближайший изомер имеет одну силоксановую диагональную связь; $Q^2_4Q^3_2$ – гексамер, структура которого подтверждена экспериментально (18 для системы56, рис. 4.8, б).

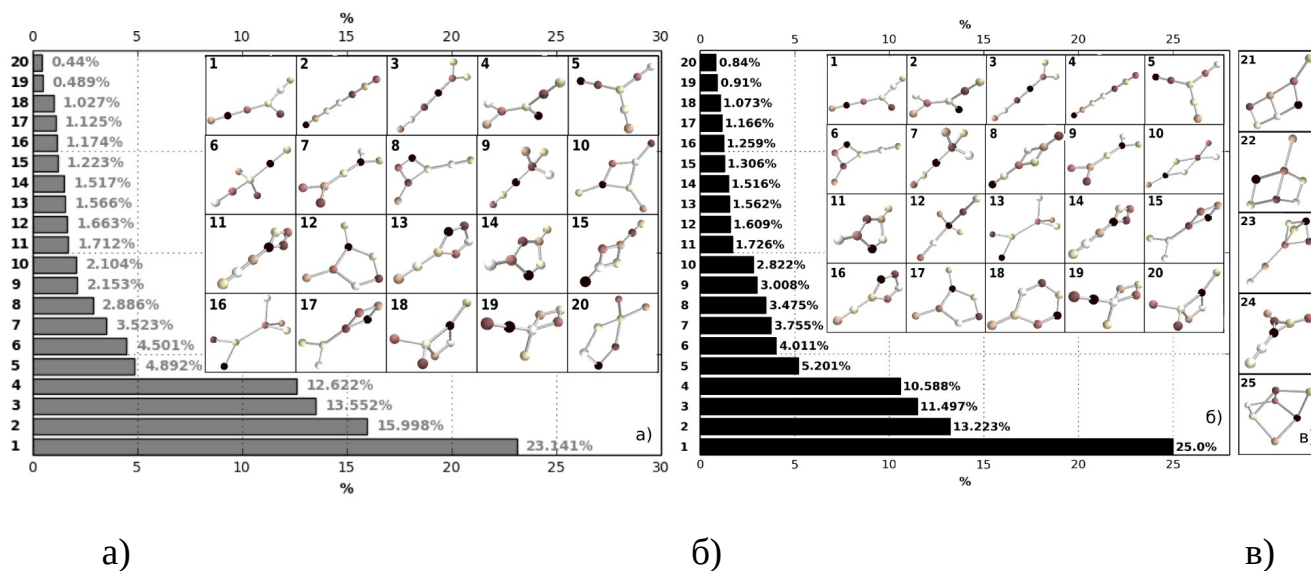


Рисунок 4.9 - Графовые представления структур кремниевых кислот, содержащих $Si_n=7$, где а - система45, б - система56, в - низкочастотные структуры, содержащие фрагменты, обнаруженные экспериментальными методами (Cho *et al.*, 2006;

Tanaka *et al.*, 2000; Lazaro *et al.*, 2017; Vorba *et al.*, 2017; Sjoberg *et al.*, 1996)

$Si_n = 8$

За весь период МД образовалось 1178 октамеров в системе45 и 3030 в системе56, что в пересчете на долю всего кремния составляет за весь период МД ~0,27% и ~0,70%. В системе45 идентифицировано 86 пространственных изомеров, 27 из которых уникальны, в то время как в системе56 изомеров – 109, из

них 35 уникальны (рисунок 4.10, а, б). Картина распределения изомеров среди октамеров сопоставима с распределением гексамеров и гептамеров. Наиболее высокочастотные изомеры представлены разветвленными формами.

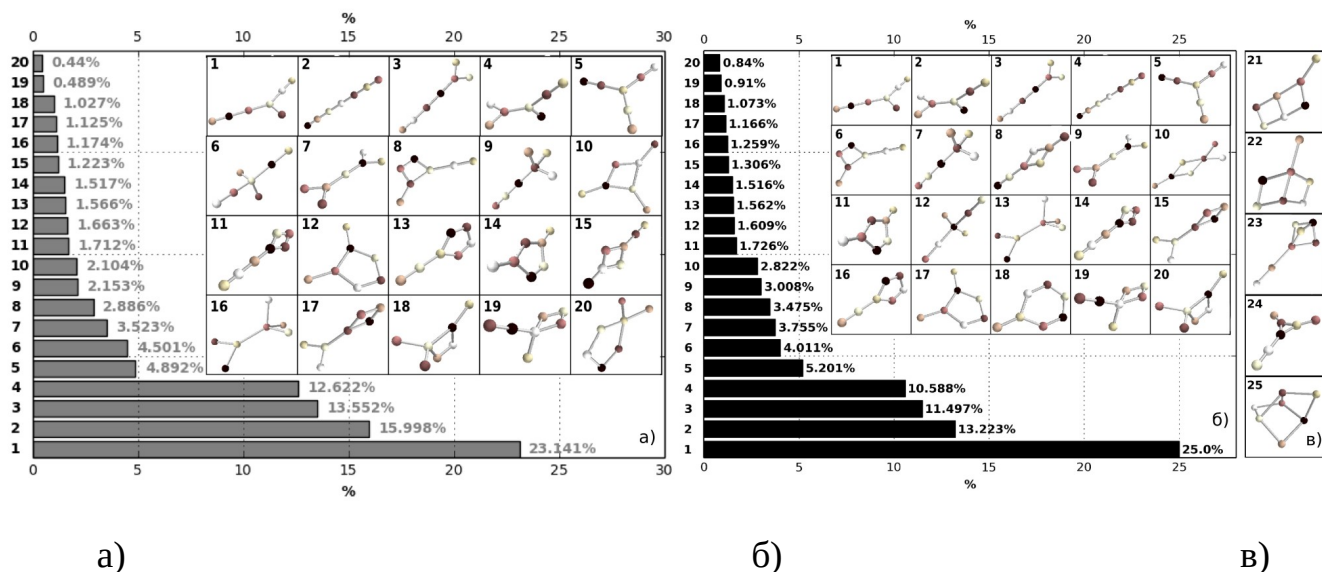


Рисунок 4.10 - Графовые представления структур кремниевых кислот, содержащих $Si_n=8$, где а - система45, б - система56, в - некоторые низкочастотные олигомеры, фрагменты которых обнаружены методом ЯМР ^{29}Si (Cho *et al.*, 2006; Knight *et al.*, 1989; Sjoberg *et al.*, 1996)

С помощью спектроскопии ЯМР ^{29}Si обнаружены лишь две структуры (Cho *et al.*, 2006; Knight *et al.*, 1989; Vorba *et al.*, 2017; Sjoberg *et al.*, 1996). Это $Q^1_4Q^3_4-$ 21 (за весь период МД образовалась 2 раза в системе56 и 1 раз для системы45) и $Q^2_4Q^3_4-$ 22 (за весь период МД в системе56 образовалась единожды). Кроме того, в моделируемых растворах образовались следующие объемные формы (24–26, рисунок 4.10, в):

- для системы56 - симметричная форма $Q^2_4Q^3_4а-$ 24 и $Q^2_2Q^3_6-$ 25;
- для системы45 можно отметить только $Q^2_4Q^3_4б-$ 26.

Среди изомеров $Si_n = 8$ встречаются мотивы, присутствующие в составе олигомеров меньшего размера. Кроме того, следует заметить, что среди полученных олигомеров не обнаружено циклических гептамеров Q^2_7 и октамеров

Q^2_8 , в экспериментальных данных они также отсутствуют (Cho *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2000; Knight *et al.*, 1989; Borba *et al.*, 2017; Sjoberg *et al.*, 1996).

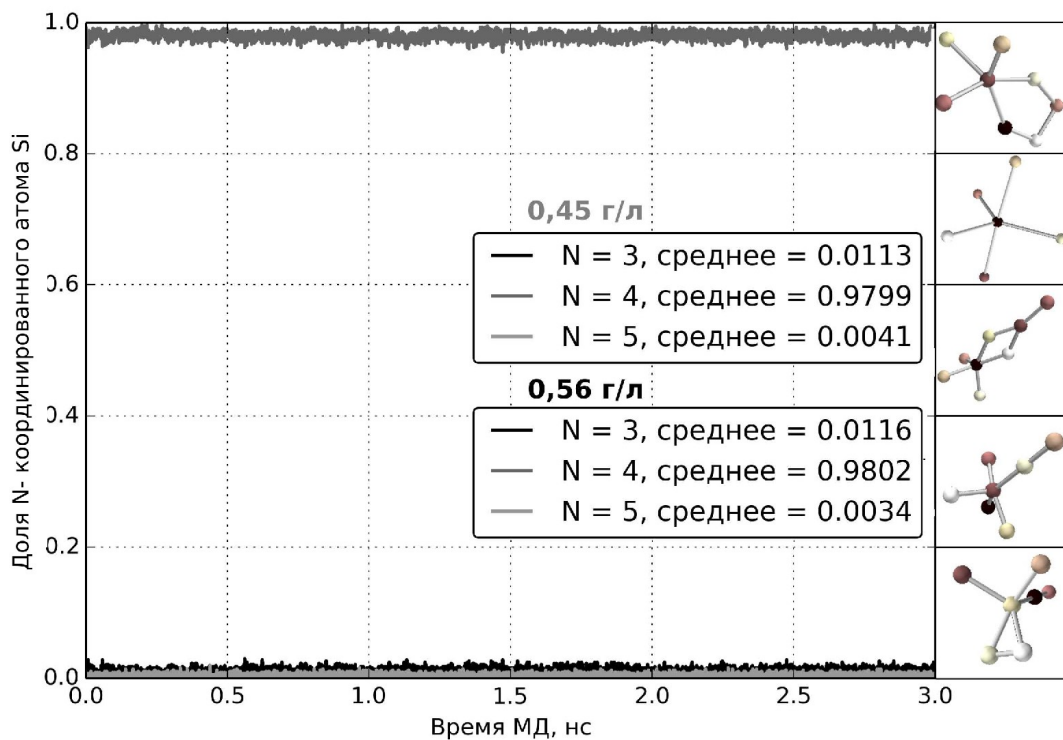
4.1.3 Оценка стабильности образующихся олигомеров кремниевых кислот

Степень координации атома Si в ходе МД.

В основе реализованного реакционного силового поля FG лежит описание структуры кварцевого стекла (Feuston and Garofalini, 1990), в котором среднее координационное число атома Si равно IV (Petitgirard *et al.*, 2019). Проведение МД при высоких температурах 1500–3000 К является частью стандартной методики (Verstraelen *et al.*, 2009; Hirakawa *et al.*, 2017; Stawicka *et al.*, 2020; Rao and Gelb, 2004; Rimsza *et al.*, 2018) вычислительных экспериментов, однако проведение расчетов при температуре 1200 К может привести к появлению Si со средним координационным числом V или VI, что характерно для физических систем при температуре выше 1500–1700 К и давлении ~20 ГПа (Petitgirard *et al.*, 2019). Ранее не была проведена проверка на среднее координационное число атома Si ни разработчиками силового поля, ни другими исследователями (Rao and Gelb, 2004; Rimsza *et al.*, 2018).

Анализ среднего координационного числа атомов Si за весь период МД показал (рисунок 4.11), что 97,99% (система45) и 98,02% (система56) всех атомов Si имеет координационное число, равное IV, а VI не встречается. V-координированный Si встречается редко, так, среди гексамеров обнаружено лишь 29 и 27 молекул, среди гептомеров 49 и 59, среди октамеров 86 и 102 для системы45 и системы56, соответственно. Можно говорить о тенденции увеличения количества структур, содержащих V-координированный Si, с ростом размеров олигомеров. Некоторые структуры, содержащие V-координированный атом Si, представлены на рисунок 4.11.

Рисунок 4.11 - Зависимость доли n-координированного Si (III - V) и олигомеров, содержащих V - координированный Si от времени эксперимента



Увеличение количества V-координированных атомов Si в структурах с большим количеством звеньев можно объяснить увеличением площади поверхности взаимодействия растущего олигомера с другими кремниевыми кислотами.

Боковой и S_{N2} механизмы конденсации кремниевых кислот в водном растворе подразумевают образование V-координированной формы Si (Pereira *et al.*, 1998). Такая структура является промежуточной, и реакция заканчивается отщеплением молекулы воды (Warring *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 1998). Из всего вышесказанного можно сделать вывод, что реакционное силовое поле FG допускает существование V-координированной формы Si, и реакции конденсации кремниевых кислот при его использовании протекают согласно классическим представлениям о данных процессах.

Стабильность геометрических параметров кремниевых кислот с ростом размера олигомеров.

Образовавшиеся олигомеры были разделены на классы в зависимости от числа атомов Si в их составе ($Si_n = 3 - 20$). Для каждой группы был произведен

расчет геометрических параметров: ковалентная связь Si-O, с порогом отрезания 2\AA , а также валентных углов: $\angle\text{Si-O-Si}$ и $\angle\text{O-Si-O}$.

По расчетам длина связи Si-O и значения валентных углов $\angle\text{Si-O-Si}$ и $\angle\text{O-Si-O}$ не изменяются с ростом кремниевой частицы (в пределах проведенной МД). Распределение длины связи Si-O и углов унимодально, отличается от нормального, с медианой $\sim 1,61\text{\AA}$ ($\sim 1,47\text{\AA} - 1,78\text{\AA}$). В экспериментальных работах отмечают, что валентные углы $\angle\text{Si-O-Si}$ и $\angle\text{O-Si-O}$ для кварца составили $\sim 146,78^\circ$ и $\sim 107,91^\circ$, а длина связи Si-O равна $1,62\text{\AA}$ (Belton *et al.*, 2010).

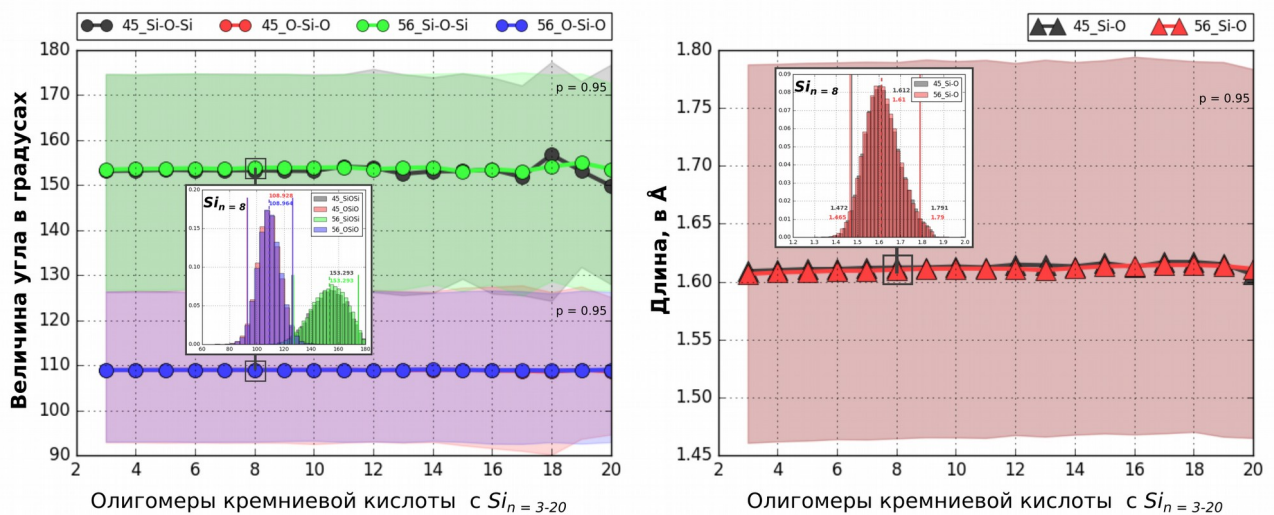


Рисунок 4.12 - Зависимость геометрических параметров от степени олигомеризации кремниевых кислот $Si_n = 3-20$

Медиана распределения величины $\angle\text{O-Si-O}$ по всем олигомерам равна $108,93^\circ$ (система45) и $108,96^\circ$ (система56). 95% интервал всех значений от $108,60^\circ$ до $108,98^\circ$ для системы45 и $108,85^\circ$ до $109,02^\circ$ для системы56.

Угол силоксановой связи $\angle\text{Si-O-Si}$ имеет медиану при $153,2^\circ$ (система45) и $153,7^\circ$ (система56). С 95% доверительным интервалом в диапазоне $150,67^\circ$ - $155,64^\circ$ (система45) и $153,08^\circ$ - $154,61^\circ$ (система56).

В целом распределение значений длины связей Si-O и углов $\angle\text{O-Si-O}$ и $\angle\text{O-Si-O}$ не зависит от размера олигомера, но вариабельность для системы45 больше, чем в системе56. Возможно это связано с увеличением концентрации кремниевых кислот в модельном растворе.

В целом реализованное силовое поле адекватно воспроизводит геометрические параметры кварцевого стекла и может быть использовано для широкомасштабного моделирования.

Время жизни силанольных и силоксановых связей.

На последнем шаге выделены образовавшиеся олигомеры и отслежена их траектории образования, на рисунке 4.13 представлены данные для самого крупного олигомера. Силоксановая связь несколько длиннее, с медианой $1,64\text{\AA}$, против $1,6\text{\AA}$ (для силанольной). Олигомер полностью распадается/образуется за ~ 90 пс. Рост олигомера во времени МД условно представлен на рисунке 4.13 справа внизу.

У тетраэдрических силикатов кремний находится в состоянии sp^3 -гибридизации. И средняя длина связей Si-O в тетраэдре $[\text{SiO}_4]$ составляет $1,62\text{\AA}$ (Коттон и Уилкинсон, 1969; Belton *et al.*, 2010). Благодаря дополнительному $d\pi - p\pi$ перекрыванию длины силоксановых связей в тетраэдре $[\text{SiO}_4]$ укорочены на $0,13\text{\AA}$ по сравнению с величинами, ожидаемыми для силанольных (Коттон и Уилкинсон, 1969).

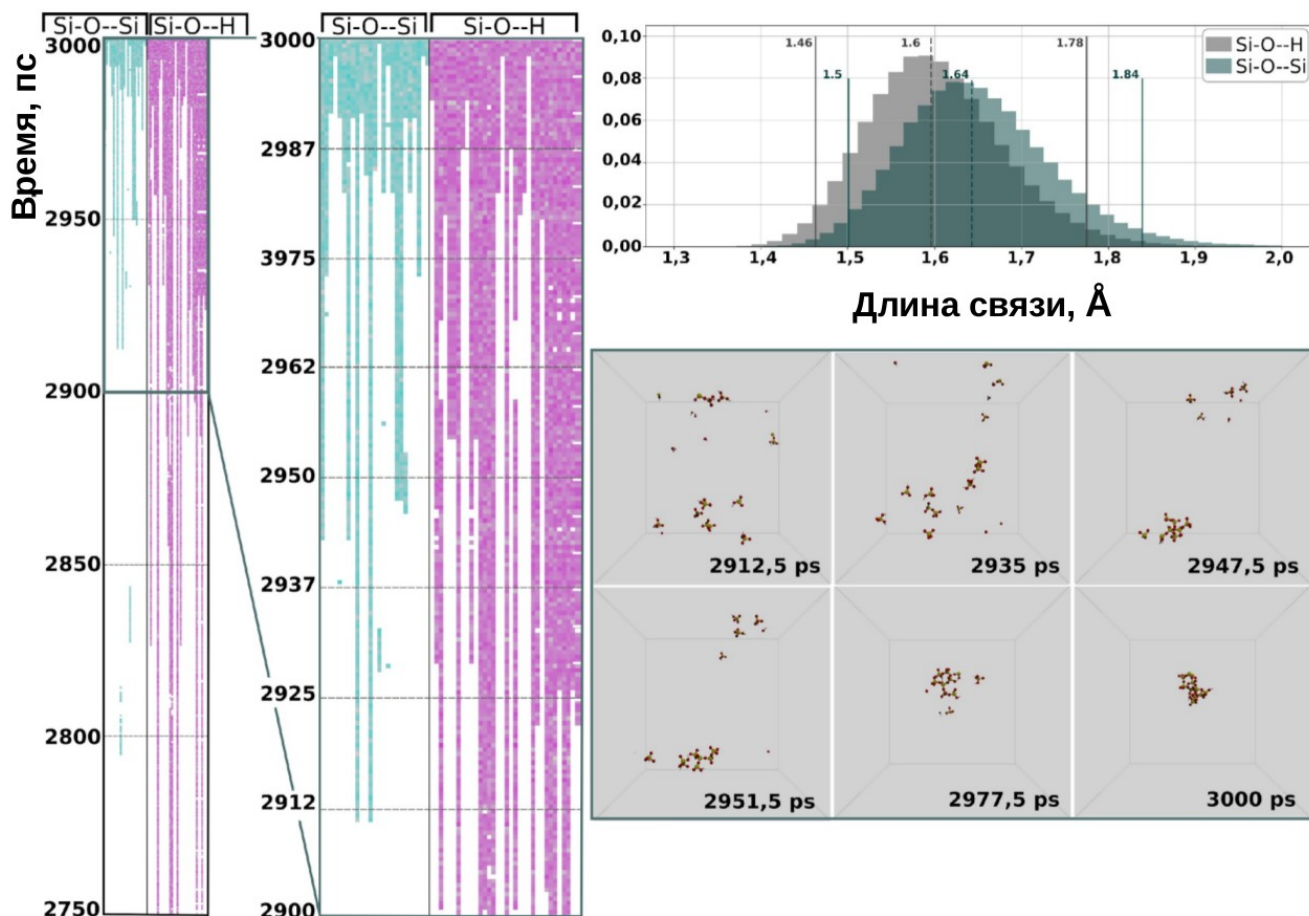


Рисунок 4.13 - Время жизни силанольных и силоксановых связей

В растущих структурах кремниевых кислот в процессе молекулярной динамики также присутствует данная закономерность, что является интересной особенностью используемого силового поля как для его применения, так и для разработки новых силовых полей, поскольку среди параметров силового поля FG отсутствуют данные для описания отдельно силанольных и силоксановых связей.

4.1.4 Избранные олигомеры кремниевых кислот для проведения молекулярного докинга

На основании полученных данных была сформирована выборка из 14 олигомеров кремниевых кислот (лигандов) с количеством атомов $Si_n = 1-6$. Избранные олигомеры (рисунок 4.14) были оптимизированы (Приложение В, таблица 2), согласно протоколу (раздел 2.3.2.6) и использованы для проведения молекулярного докинга в двух моделях силикатеина- α .

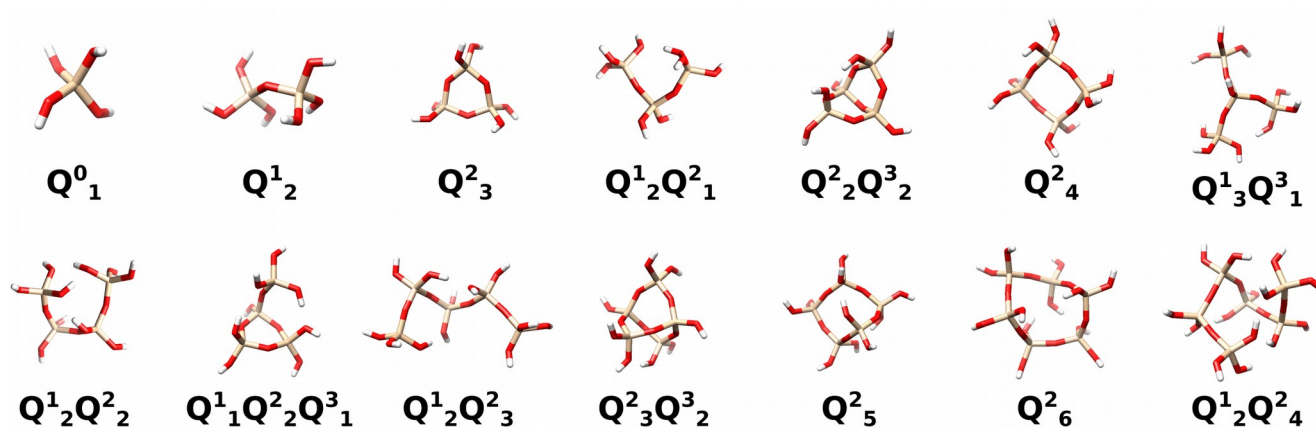
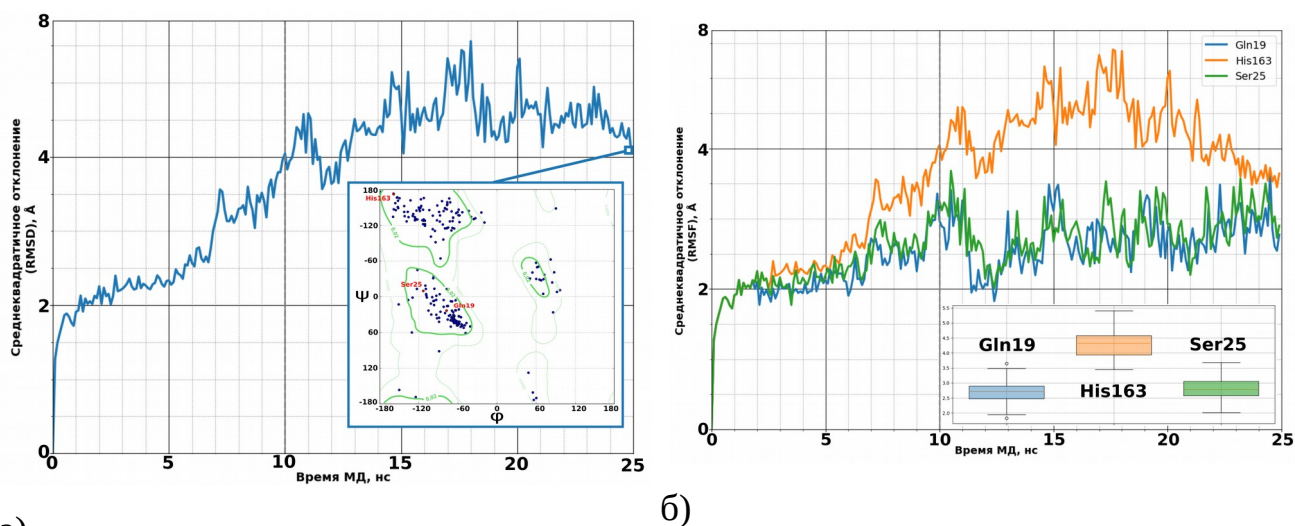


Рисунок 4.14 — Лиганды, использованные для проведения молекулярного докинга

4.2 Оценка качества и подвижности молекулярной модели силикатеина- α для поиска областей связывания

Для оценки качества модели использовали МД. Продолжительность МД силикатеина- α (химерной формы 2VHS) составила 25нс. Изменение среднеквадратичного отклонения (RMSD) всего белка с течением времени выходит на плато на 10нс. Медиана RMSD составила 4,46 Å (3,77 — 5,17Å), для временного диапазона 10-25нс (рисунок 4.15, а). Карта Рамачандрана для последнего шага МД (рисунок 4.15, а) показывает, что большинство двугранных углов пептидного остова (ψ и ϕ) лежат в разрешенных зонах: His163 в области β -листов, Ser25 и Gln19 в области правой α -спирали. Динамика изменения среднеквадратичной флуктуации АО (RMSF) активного центра (рисунок 4.15, б) на интервале 10-25нс показывает, что Gln19 и Ser25 менее подвижны на всем интервале МД с медианой 2,72 Å (2 - 3,4 Å) и 2,78 Å (2,2 - 3,5 Å), в то время как медиана RMSF His163 4,3 Å (3,5 - 5,2 Å).

Динамика расстояний между функциональными группами АО активного центра представлена на рисунке 4.15. В ходе МД Gln19 удаляется от Ser25, с ~ 4 Å до ~ 10 Å, одновременно с этим наблюдается сближение С α атом His163 с О гидроксильной группы Ser25 с ~ 6 Å до ~ 3 Å. Данное расстояние достаточно для формирования устойчивой водородной связи His163- пN и HO -Ser25.



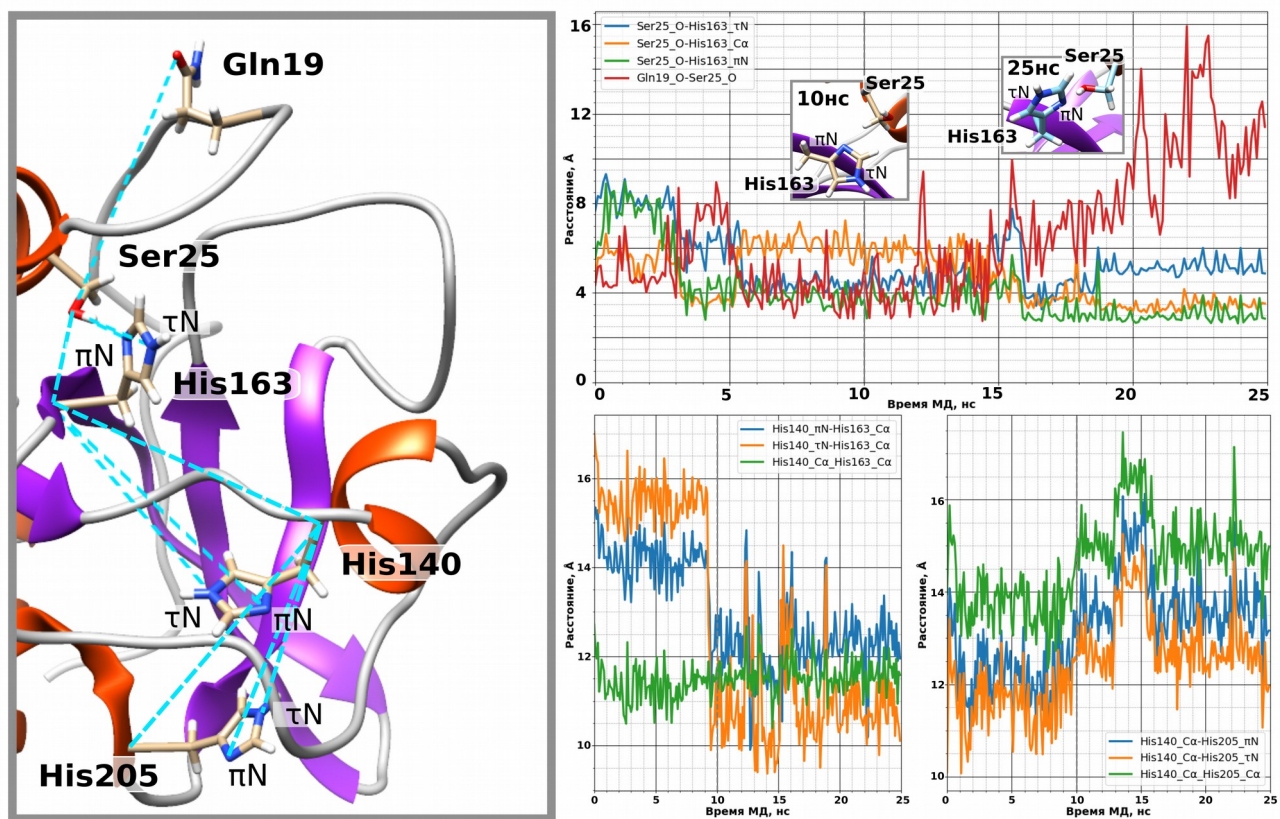
а)

б)

Рисунок 4.15 — Динамика изменения среднеквадратичного отклонения атомов а) белка и б) отдельных АО в течение 25нс МД

Конформационная подвижность His163 АЦ силикатеина- α может играть значимую роль в инициации активации кремниевых кислот с различной длиной цепочки (Szóri-Dorogházi *et al.*, 2012). Была проведена оценка изменения расстояний между О-гидроксила Ser25 и тремя атомами His163, это: C α (часть остова), а так же τ N и ρ N – азоты имидазольного кольца (рисунок 4.16). На всей протяженности МД ρ N-His163 остается ориентированным к О-Ser25, несмотря на частичное вращение плоскости имидазольного кольца His163. Колебание значения водородной связи His163- ρ N---HO-Ser25 находится в диапазоне 2-4 Å (рисунок 4.16), что согласуется с экспериментальной величиной в 3,6Å (Görlich *et al.*, 2020).

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



а)

б)

Рисунок 4.16 — а) Схема пар расстояний между wybranными атомами; б) - Динамика изменения расстояний избранных пар атомов

В целом полученная структура силикатеина- α является хорошо подготовленной для проведения молекулярного докинга, аминокислоты активного центра уравновешены и располагаются в допустимых зонах двугранных углов пептидного остова (ψ и ϕ). Аминокислотные остатки, которые предположительно осуществляют катализ, имеют незначительную среднеквадратичную подвижность (RMSF) в пределах $3,5\text{\AA}$.

В структуре силикатеина- α отсутствуют некоторые АО, поэтому по первичной последовательности была построена модель пре-силикатеина- α согласно протоколу (раздел 2.3.1). Лучшая из предсказанных структур была использована для дальнейшей работы. Предсказанная полная модель пре-силикатеина- α показала хорошую оценку качества, сопоставимую с оценками экспериментальных моделей (Приложение В, таблица 3). Структурное

выравнивание предсказанной структуры пре-силикатеина- α хорошо выравнивается с экспериментально полученными структурами (pdb 6ZQ3 (Görlich *et al.*, 2020) и pdb 2VHS-A (Fairched *et al.*, 2009)). Кроме того предсказанная модель является более полной: во-первых, в ее структуре представлен пропептидный участок, кроме того, в ней определены координаты атомов всех аминокислотных остатков зрелого белка, в структуре 2VHS-A отсутствует участок Ser174-Gln180, в структуре 6ZQ3 нет участка Ile174- Gln179 (Приложение В, рисунок 1) .

Выравнивание предсказанной структуры пре-силикатеина- α и прокатепсина L (pdb 1CS8), показало хорошее наложение пропептидного участка в районе, содержащем катепсиновый пропептид-ингибиторный домен I29 (Приложение В, рисунок 2)(позиции аминокислот 29 - 117).

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

4.3 Поиск областей связывания силикатеина- α с избранными кремниевыми кислотами

Поиск областей связывания силикатеина- α с 14 подготовленными кремниевыми кислотами проводился согласно протоколу (2.3.3) и разделен на два этапа. Глобальный поиск по всей поверхности позволил выделить несколько областей связывания и на следующем этапе проводить поиск в выделенных областях с радиусом возможного отклонения 30Å.

Для структуры пре-силикатеина- α сформировались 3 области связывания: Asp68, Thr329 и Ser131 (Приложение В, рисунок 3), для структуры силикатеина- α были выбраны схожие регионы: Asp6, Thr94 и Ser25.

Для каждой области методом Монте-Карло было сгенерировано 500 положений. На основании энергии связывания были выбраны все состояния, энергия которых имеет отрицательное значение. Для визуализации областей связывания были использованы лишь 20 состояний с наименьшей энергией связывания (Приложение В, рисунок 4 — пре-силикатеин- α ; Приложение В, рисунок 5 — силикатеин- α).

Для пре-силикатеин- α вблизи Asp329 выделяется одна область взаимодействий, в независимости от типа и размера лиганда. Для областей вблизи Ser131 для лигандов с количеством атомов $Si_n = 1-4$ и Thr329 для лигандов Q^1_2 , $Q^1_2Q^2_1$, $Q^2_2Q^3_2$, $Q^2_3Q^3_2$ выявлено по две области. Для силикатеина- α вокруг каждого центра формируется одна область взаимодействия. Наибольшие значения энергии для каждого вида лигандов представлены на рисунке 4.17.

Максимальная энергия связывания среди трех областей докирования для большинства лигандов приходится на область вблизи активного центра (Ser131, с максимумом -16,1 ккал/моль). Исключение составляют Q^2_5 , $Q^2_3Q^3_2$ и $Q^1_2Q^2_4$, для которых областью с максимальной энергией связывания является область вблизи Thr329 (с максимумом -12,55 ккал/моль). Среди групп изомеров максимальными энергиями связывания обладают комплексы фермент-линейный или разветвленный лиганд для областей Ser131 и Thr329 за исключением группы лигандов $Si_n = 4$.

Для лигандов с длиной цепочки $Si_n = 1-4$ (по абсолютным значениям) и для $Si_n = 1-6$ (по медианам, рисунок Приложение В, рисунки 6-7) наблюдается прямая корреляция размера лиганда и энергии связывания вблизи трех выделенных областей. Область вблизи Asp68 является наименее предпочтительной, но тем не менее энергия связывания находится в диапазоне от -3,6 до -9,1 ккал/моль для всех рассмотренных лигандов.

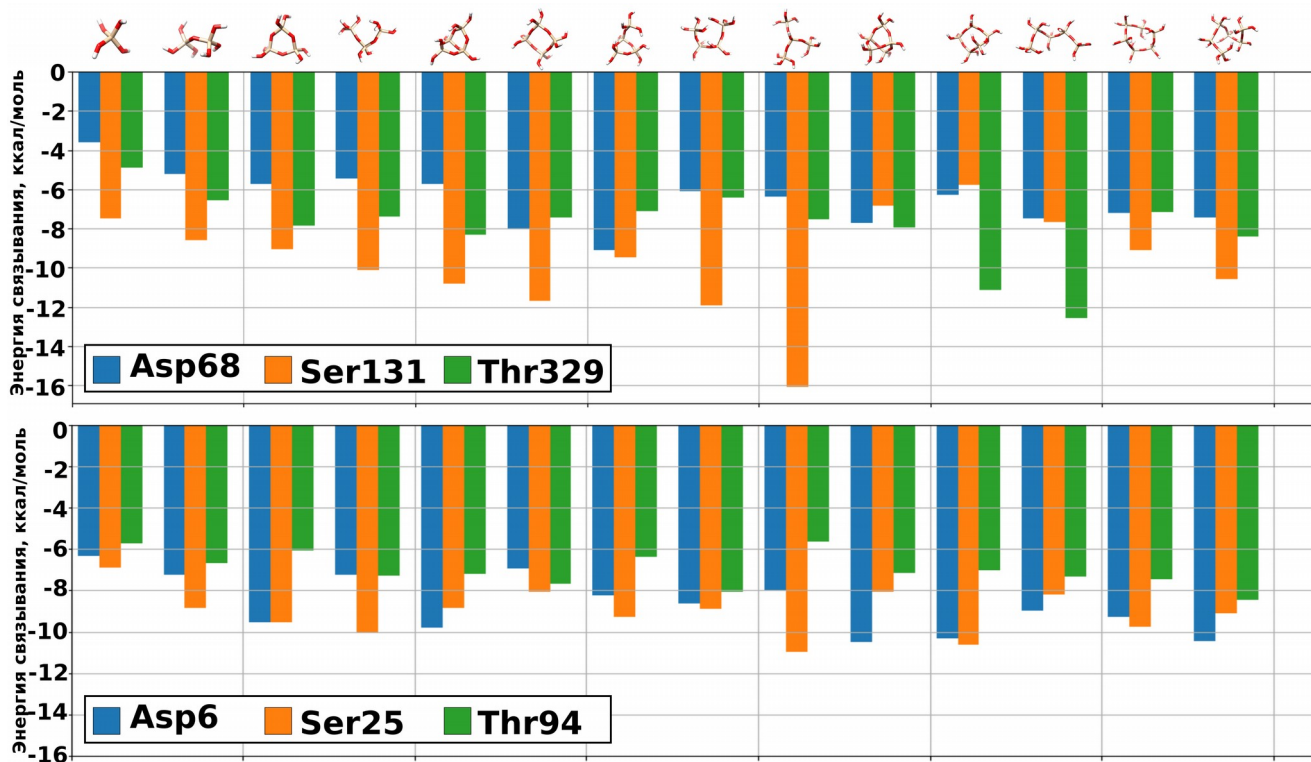


Рисунок 4.17 — Максимальные энергии связывания для каждого типа лигандов с пре-силикатеином- α (верхний), силикатеином- α (нижний).

Для силикатеина- α центр, вблизи которого происходит докирование лиганда с максимальными энергиями связывания в каждой группе (по количеству атомов $Si_n = 1-5$), это вблизи активного центра (Ser25). Среди изомеров $Si_n = 4-5$ максимальная энергия связывания приходится на линейную и разветвленную форму лигандов с максимумом для этой области в $-10,96$ ккал/моль. Область связывания вблизи Asp6 интересна тем, что для изомеров из групп $Si_n = 3-5$ максимальной энергией связывания обладают комплексы фермента с циклическими изомерами лигандов с разницей энергии в $\sim 1,4$ ккал/моль. Связывание лигандов с областью вблизи Thr94 значительно ниже, чем с другими регионами, но тем не менее максимальные значения располагаются в диапазоне $-5,7-8,4$ ккал/моль.

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

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

В стабилизации лигандов в областях связывания принимают участие АО, относящиеся к разным классам по строению радикала. На рисунках Приложение В 8 и 9 суммированы данные взаимодействия лигандов с АО пре-силикатеин- α и силикатеин- α . В целом следует отметить, что с увеличением размера лиганда область взаимодействия расширяется. Для пре-силикатеин- α области вблизи активного центра для малых олигомеров разделены на 2 части, которые с увеличением размеров сливаются в одну область с общими АО: Glu132, Ser131 (АО активного центра), Asp134, Lys130, Ser298 (Приложение В, рисунок 8). Для силикатеин- α регион вблизи активного центра и Thr94 имеют общие АО, это: Asn66, Cys65 (Приложение В, рисунок 9).

4.4 Белок-белковый докинг силикатеина- α

Предположительно силикатеин- α выполняет 2 функции: первая — ферментативная; вторая — структурообразующую за счет формирования протяженных нитей (Wang *et al.*, 2014; Riesgo *et al.*, 2015). По данным рентгеноструктурного анализа кристаллов силикатеина- α (Fairhead *et al.*, 2008) и комплекса силикатеина- α с силикатами в составе спикулы (Görlich *et al.*, 2020), получены противоречивые данные, и вопросы стыковки функциональных единиц фермента остаются открытыми.

В связи с этим становится важным рассмотреть сайты взаимодействия силикатина- α с идентичной субъединицей. Поиск областей связывания проводился в программном комплексе ROSIE (Lee and Zhang, 2012) по всей поверхности силикатеина- α _A. Результаты девяти лучших вариантов (силикатеина- α _A1-9) стыковки приведены в таблице (Приложение В, таблица 4).

Все полученные модели, обладающие максимальной аффинностью докируются с одной стороны (рисунок 4.18 а,б) и разделяются на две группы (рисунок 4.18):

первая: силикатеин- α _A-A1 — A2 — включает две модели;

вторая: силикатеин- α _A-A3 — A9 — включает семь моделей.

Наибольшей энергией связывания обладают комплексы, относящиеся к первой группе, при этом следует отметить, что отличие второй группы от первой не превышает 0,3 ккал/Моль.

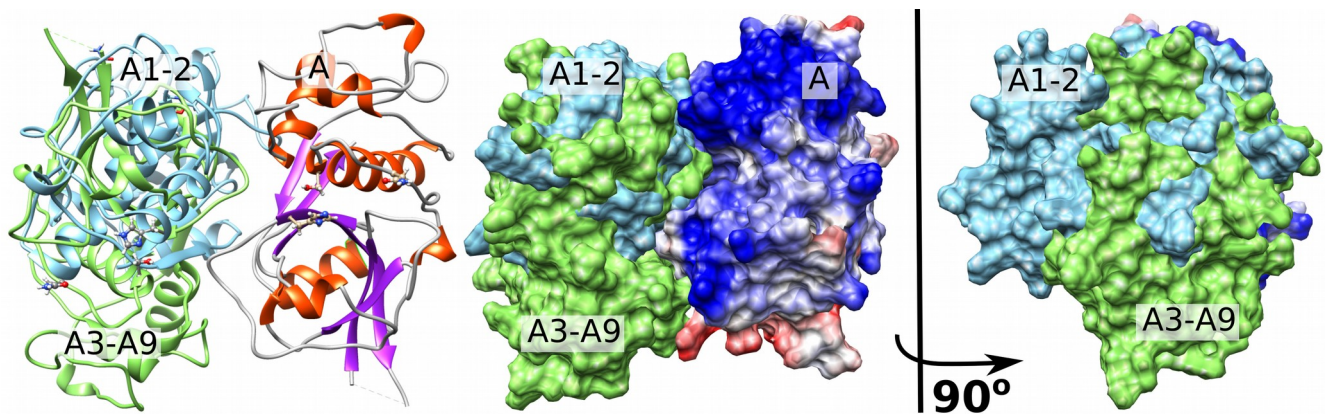


Рисунок 4.18 — Взаимное расположение результатов двух групп молекулярного белок-белкового докинга. Лиганды (салатовая — вторая группа и бирюзовая - первая) и рецептор (сине-красно-белая поверхность) - силикатеин- α . Активные центры первой группы (силикатеин- α _A-A1—A2) располагаются перпендикулярно друг к другу, в то время как для второй группы силикатеин- α _A-A3—A9 — активные центры располагаются по одну сторону.

АО, принимающие участие в формировании комплекса рецептор-лиганд, располагаются в одной области молекулы силикатеина- α (рисунок 4.19). Аминокислотные остатки, принимающие участие во взаимодействии рецептора с лигандами в первой группе (рисунок 4.19): Glu75, Phe112, Ser160, Leu161; во второй группе: Asp71, Tyr72, Lys117, Ser158, Leu161.

Со стороны молекулы лиганда АО, принимающие участие в взаимодействии для первой группы (рисунок 4.19): Tyr72, Glu75, Phe112, Ser159, Ser160; для второй группы: Tyr72, Glu75, Phe112, Lys117, Ser159, Ser160, Arg206. Выделенные АО частично пересекаются с данными оценки поверхности силикатеина- α на

степень гидрофобности, доступности для связывания с молекулой ортокремниевой кислоты (Murr and Daniel, 2005) и включают области: 72–80 АО и 151-159 АО .

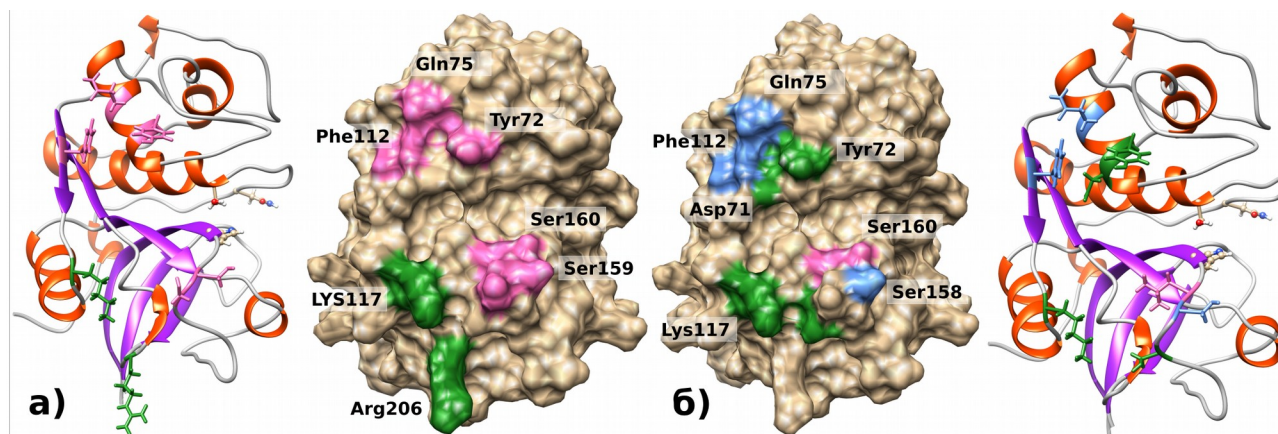


Рисунок 4.19 — АО областей связывания рецептора и лигандов (1-9) (силикатеин- α), где а) — поверхность рецептора, б) — поверхность лигандов. Условные обозначения: голубой цвет — АО первой группы, зеленый цвет — второй группы, розовый цвет - обе

АО на поверхности рецептора и лиганда располагаются в общей области связывания (рисунок 4.19). Такое расположение позволяет сделать вывод, что стыковка субъединиц силикатеина- α замыкается, формируя димер. При этом активные центры каждого силикатеина для первой группы располагаются перпендикулярно плоскости стыковки, а для второй группы располагаются по одну сторону.

Расположение на одной поверхности силикатеина- α (рисунок 9, Приложение В) позволяет визуально оценить отсутствие взаимного перекрытия областей: активного центра, центров потенциального связывания с природными субстратами (кремниевыми кислотами) и областью связывания со второй молекулой силикатеина- α .

Можно предположить, что созревание силикатеина- α сложный процесс, и в его регуляции задействованы силикаты. Возможны две альтернативные формы зрелого силикатеина- α в зависимости от условий. Один вариант сходен с созреванием катепсином L, в этом случае отрезается фрагмент белка,

включающий аминокислотные остатки 1..115, что приводит к открытию ферментативного активного центра, кроме того, в этом случае открыта область, в которой происходит взаимодействие с другим мономером, и образуется димер (рисунок 4.19), с чего начинается спикүлогенез. Альтернативный вариант, когда отрезается фрагмент 1..86, содержащий ингибитор I29, и активируется ферментативная функция остается большая петля 87..115, которая не дает образоваться димеру, но АО которой активно участвуют во взаимодействии с силикатами в трех из четырех выявленных областях в экспериментах по молекулярному докингу – Ser131_1, Ser131_2, Thr329 (Приложение В, рисунок 4). В этом случае силикатеин в мономерном виде осуществляет ферментативную поликонденсацию ортокремниевой кислоты. Экспериментально такой вариант был показан у *Suberites domuncula* в присутствии мочевины (Wang *et al.*, 2014).

Таким образом, в структуре пре-силикатеина-а выявлены районы, которые могут регулировать его созревание в зависимости от условий, при чем силикаты могут участвовать в этом процессе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

энергетическим барьером прямой реакции переноса H^+ в 14,2 ккал/моль и низким для обратной 1,7 ккал/моль. Энергия активации для молекулы $Si(OH)_4$ по S_{N2} механизму приходится на затраты 11,3 ккал/моль, в то время как энергия активации по боковому механизму несколько выше и соответствует 17,3 ккал/Моль (Brinker *et al.*, 1989; Trinh *et al.*, 2006).

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

Для проведения поиска областей связывания силикатеина- α с кремниевыми кислотами был сформирован набор наиболее высокочастотных и некоторых интересных форм олигомеров кремниевых кислот. Для этого была сформирована система, состоящая из равноудаленных молекул $Si(OH)_4$, растворенная в воде (ТIPЗР), и реализовано силовое поле FG. Исследование зависимости олигомерного разнообразия и долей олигомеров от концентрации $Si(OH)_4$ в растворе для двух систем, отличающихся концентрацией мономеров показаны общие тенденции

доминирования линейных и разветвленных форм олигомеров исходства распределения высокочастотных олигомеров. Для обеих систем на начальном этапе моделирования (менее 0,5 нс) характерен рост количества олигомерных структур с содержанием атомов ($Si_n=3-5$). В диапазоне 0,5–3нс наблюдается медленный рост количества олигомеров с более длинной цепочкой, а именно ($Si_n=6-8$). Установлено, что на протяжении всего эксперимента сохраняется высокое значение доли димеров. За весь период МД до ~98% атомов Si имели степень координации IV. Наличие в изученных системах атомов Si со степенью координации V может говорить об образовании промежуточных комплексов в процессе полимеризации кремниевых кислот.

В рамках исследования определены траектории формирования циклического тримера, бициклического тетрамера и олигомера типа $Q^1_2Q^2_2Q^4_1$, для которых получены поэтапные схемы образования и предложен механизм их образования, подразумевающий сценарий их формирования из димерных структур. Отметим, что структура и представленность олигомера типа $Q^1_2Q^2_2Q^4_1$ получены впервые в рамках МД-моделирования и на данный момент такая структура не идентифицирована при помощи экспериментальных методов.

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

Избранные олигомеры были оптимизированы и использованы для проведения молекулярного докинга с целью поиска областей связывания силикатеина- α с силикатами. Лиганды с длиной цепи $Si_{n=1-6}$ с силикатеином- α имеют три региона связывания вблизи АЦ; рядом с Asp6, Ser25 и Thr94 с максимальной аффинностью в -16,1 ккал/моль для пре-силикатеина- α и -10,96 ккал/моль. Максимальной аффинностью к силикатеину среди лигандов обладают

линейные и разветвленные формы. Полярные и положительно заряженные АО пропептидного фрагмента (позиции 1..116) участвуют во взаимодействии с лигандами во всех 3-х выявленных областях. При докировании малых лигандов $Si_n=1-4$ в структуру пре-силикатеина- α область связывания вблизи Ser131 разделяется на две группы, которые объединяются в одну область с увеличением размера лиганда. Лиганды Q^2_5 , $Q^2_3Q^3_2$ и $Q^1_2Q^2_4$ имеют максимальную аффинность к региону вблизи Thr329, циклические изомеры $Si_n=3-5$ имеют максимальную аффинность к району Asp6. При образовании димеров силикатеина- α области стыковки не перекрываются с регионами адгезии кремниевых кислот.

Таким образом, проведенная оценка разнообразия кремниевых кислот в водном растворе определила спектр потенциальных природных субстратов силикатеина- α . Изучение биофизических особенностей конфигурации аминокислотных остатков активного центра силикатеина- α и областей его взаимодействия с силикатами позволило предложить наиболее вероятные пути активации кремниевых кислот на начальном этапе биосилификации.

ВЫВОДЫ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) **Акберова, Н.И.** Сравнение методов расчета электростатических взаимодействий в алгоритмах для графических акселераторов / Н.И. Акберова, Д.И. Алишева, Е.Д. Изотова, Д.С. Тарасов // Ученые записки казанского государственного университета.- 2008.- Т. 150.- кн. 2.- С. 71-81.
- 2) **Ким, И. П.** Кинетика поликонденсации. II. Изменяющиеся во времени спектры ЯМР ^{29}Si поли-диметилдиметоксисилана (поли-дмдмос) / И.П. Ким, А. В. Черняк, В. А. Бендерский // Химия высоких энергий.- 2020. - Т. 54. - № 3. - С. 171-179.
- 3) **Кондратов, И. Г.** Выделение и идентификация нового белка из спикул пресноводной губки *Baicalospongia bacillifera* / И. Г. Кондратов, И. С. Соловаров, Н. Н. Деникина, О. Г. Лопатовская, С. И. Беликов // Известия Ирнутакого государственного университета. Серия «Биология. Экология». - 2012. - Т. 5. - № 4. - С. 147-151.
- 4) **Лавров, А. И.** Реагрегация клеток губок: механизмы и динамика процесса/ А. И. Лавров, И. А. Косевич // Онтогенез. - 2014. - Т. 45. - №4. - С. 250–271.
- 5) **Оберемок, В. В.** Учебный материал практических занятий по дисциплине «Биохимия» (дополнительный материал по роли макроэргических связей и слабых химических взаимодействий в жизни клетки) / В.В.Оберемок, Н.Н.Левченко // учебно-методическое пособие. — Симферополь: ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского». - 2016. — 31 с.
- 6) **Потапов, В. В.** Численное моделирование поликонденсации ортокремниевой кислоты и образования частиц кремнезема в гидротермальных растворах / Потапов В. В., Сердан А. А., Кашутина И. А. // Вулканология и сейсмология. - 2019. - № 4. - С. 18-28.
- 7) **Таганович, А. Д.** Биологическая Химия / А. Д. Таганович, Э. И. Олецкий, Н. Ю. Коневалова, В. В. Лелевич // учебник под общей ред. А. Д. Тагановича, 2-ое издание. исправленное. - Минск: Высшая школа. - 2016. - 617 с.

- 8) **Тарасов Д. С.**, Ибрагимова М.Я., Изотова Е.Д., Акберова Н.И., Жданов Р.И. Молекулярная динамика и свободная энергия связывания линолевой кислоты с ДНК в водном растворе/ Д.С. Тарасов, М.Я. Ибрагимова, Е.Д. Изотова, Н.И. Акберова, Р.И. Жданов // Доклады Академии наук, 2012. - Т. 446, № 2. - С. 226-231.
- 9) **Тарасов, Д. С.** GRAMM – программный пакет для расчетов молекулярной динамики на графических процессорах / Д. С. Тарасов, Е. Д. Изотова, Д. А. Алишева, Н. И. Акберова // Математическое моделирование. - 2009. - Т. 21. - № 3. - С. 31-40.
- 10) **Annenkov, V. V.** Silica Composite Nanoparticles: Model of the Silicic Acid Cytoplasmic Pool and as a Silica Precursor for Composite Materials Formation / V. V. Annenkov, E. N. Danilovtseva, V. A. Pal'shin, Vladimir O. Aseyev, A. K. Petrov, A. S. Kozlov, S. V. Patwardhan, C. C. Perry // *Biomacromolecules*.- 2011.- V. 12.- P. 1772–1780.
- 11) **Aoki, H.** Molecular and enzymatic properties of a cathepsin L-like proteinase with distinct substrate specificity from northern shrimp (*Pandalus borealis*) / H. Aoki, M. N. Ahsan, S. Watabe // *J. Comp. Physiol.*- 2004. - V. 174. - No. 1. - P. 59-69.
- 12) **Arey, B. W.** Fibrillar organic phases and their roles in rigid biological composites / B. W. Arey, J. J. Park, G. Mayer // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* - 2015. - V. 46. - P. 343–349.
- 13) **Arutyunova, E.** Allosteric regulation of rhomboid intramembrane proteolysis / E. Arutyunova, P. Panwar, P. M. Skiba, N. Gale, M. W. Mak, M. J. Lemieux // *The EMBO journal*. - 2014. - V. 33. - No. 17. - P. 1869-1881.
- 14) **Bachovchin, W. W.** 1985. Confirmation of the assignment of the low-field proton resonance of serine proteases by using specifically nitrogen-15 labeled enzyme / W. W. Bachovchin // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1985. - V. 82. - P. 7948–7951.
- 15) **Baines, S. B.** Significant silicon accumulation by marine picocyanobacteria / S. B. Baines, B. S. Twining, M. A. Brzezinski, J. W. Krause, S. Vogt, D. Assael, H. McDaniel // *Nature Geoscience*.- 2012.- V. 5.- P. 886–891.
- 16) **Belton, D. J.** An overview of the fundamentals of the chemistry of silica with

- relevance to biosilification and technological advances / D. J. Belton, O. Deschaume, C. C. Perry // FEBS. J. - 2010. - V. 279.- P. 1710-1720.
- 17) **Belton, D. J.** Putrescine homologues control silica morphogenesis by electrostatic interactions and the hydrophobic effect / D. J. Belton, S. V. Patwardhan, C. C. Perry // Chem. Commun. - 2005.- P. 3475-3477 .
- 18) **Biswas, R. K.** Study of short range structure of amorphous Silica from PDF using Ag radiation in laboratory XRD system, RAMAN and NEXAFS / R. K. Biswas, P. Khan, S. Mukherjee, A. K. Mukhopadhyay, J. Ghosh, K. Muraleedharan // Journal of Non-Crystalline Solids. - 2018. - V. 488. - P. 1-9.
- 19) **Blow, D. M.** Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin / D. M. Blow, J. J. Birkoft, B. S. Hartley // Nature. - 1969. - V. 221. - P. 337–340.
- 20) **Borba, A.** Spectroscopic characterization of silica aerogels prepared using several precursors – effect on the formation of molecular clusters / A. Borba, J. P. Vareda, L. Durães, A. Portugal, P. N. Simões // New Journal of Chemistry.- 2017.- V. 41.- I. 14.- P. 6742-6759.
- 21) **Brinker, C. J.** Hydrolysis and condensation of silicates: effects on structure / C. J. Brinker // Journal of Non-Crystalline Solids. - 1988. - V. 100. - P. 31-50.
- 22) **Brinker, C. J.** Spinnability of Silica Sols-Structural and Rheological Criteria / C. J. Brinker, R. A. Assink // Journal of Non-Crystalline Solids. - 1989. - V. 111. - P. 48-54.
- 23) **Brooks, B. R.** CHARMM: The Biomolecular Simulation Program /B.R. Brooks, C.L. Brooks III, A.D. MacKerell, Jr., L. Nilsson, R.J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caflisch, L. Caves, Q. Cui, A.R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R.W. Pastor, C.B. Post, J.Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R. M. Venable, H. L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D.M. York, M. Karplus// J. Comput. Chem.- 2009.- V.30.- P. 1545-1614
- 24) **Butler, K. T.** Calculation of the ^{29}Si NMR Chemical Shifts of Aqueous Silicate Species / K. T. Butler, D. W. Lewis // J. Phys. Chem. A.- 2012.- V. 116. - N. 34. - P.

- 8786-8791.
- 25) **Cárdenas, P.** Sponge systematics facing new challenges / P. Cárdenas, T. Pérez, N. Boury-Esnault // *Adv Mar Biol.* - 2012. - V. 61. - P. 179–209.
- 26) **Carter, P.** Dissecting the catalytic triad of a serine protease / P. Carter, J. A. Wells // *Nature.* - 1988. - V. 332. - P. 564–568.
- 27) **Catlow, C. R. A.** Computer Modeling of Nucleation, Growth, and Templating in Hydrothermal Synthesis / C. R. A. Catlow, D. S. Coombes, D. W. Lewis, J. C. G. Pereira // *Chem. Mater.* - 1998. - V. 10. - P. 3249–3265.
- 28) **Cha, J. N.** Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro / J. N. Cha, K. Shimizu, Y. Zhou, S. C. Christiansen, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, D. E. Morse // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1999. - V. 96. - P. 361–365.
- 29) **Chemcraft** - graphical software for visualization of quantum chemistry computations [Электронный ресурс]. – 2019. – Режим доступа: <https://www.chemcraftprog.com> – Дата доступа: 12.06.2021.
- 30) **Chen, Y.** Monitoring solvent dynamics and ion associations in the formation of cubic octamer polyanion in tetramethylammonium silicate solutions / Y. Chen, N. M. Washton, R. P. Young, A. J. Karkamkar, J. J. De Yoreob, K. T. Mueller // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2019. - V. 21. - P. 4717–4720.
- 31) **Cho, H.** Solution State Structure Determination of Silicate Oligomers by ²⁹Si NMR Spectroscopy and Molecular Modeling / H. Cho, A. R. Felmy, R. Craciun, J. P. Keenum, N. Shah, D. A. Dixon // *J. AM. CHEM. SOC.* - 2006. - V. 128. - P. 2324–2335.
- 32) **Chung, C. H.** Endopeptidase La / C. H. Chung, A. L. Goldberg // Elsevier, London, UK. - In *Handbook of proteolytic enzymes*, 2nd ed. - 2004. - P. 1998–2002.
- 33) **Conlin, C. A.** Cloning and nucleotide sequence of the cyclic AMP receptor protein-regulated *Salmonella typhimurium* pepE gene and crystallization of its product, an aspartyl dipeptidase / C. A. Conlin, K. Hakensson, A. Liljas, C. G. Miller // *J. Bacteriol.* - 1994. - V. 176. - P. 166–172.

- 34) **Corey, D.** An alternate geometry for the catalytic triad of serine proteases / D. Corey, M. E. McGrath, J. R. Vasquez, R. J. Fletterick, C. S. Craik // *J. Am. Chem. Soc.* - 1992. - V. 114.- P. 4905–4907.
- 35) **Cowenab, B. J.** Bond-order reactive force fields for molecular dynamicssimulations of crystalline silica / B. J. Cowenab, M. S. El-Genk // *Comput. Mater. Sci.*- 2016.- V. 111.- P. 269–276.
- 36) **Craik, C. S.** The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases / C. S. Craik, S. Roczniak, C. Largman, W. J. Rutter // *Science.* - 1987. - V. 237.- P. 909–913.
- 37) **Criscenti, L. J.** Silicate glass and mineral dissolution: calculated reaction paths and activation energies for hydrolysis of a Q3 Si by H₃O⁺ using ab initio methods / Criscenti L. J., J. D. Kubicki, S. L. Brantley // *J. Phys. Chem. A.* - 2006. - V. 110. - P. 198-206.
- 38) **Cuko, A.** Global optimisation of hydroxylated silica clusters: A cascade Monte Carlo Basin Hopping approach / A. Cuko, T. Maciá, M. Calatayud, S. T. Bromley// *Computational and Theoretical Chemistry.*- 2017.- V. 1102. - P. 38-43.
- 39) **Curnow, P.** Biocatalytic Synthesis of Poly (L Lactide) by Native and Recombinant Forms of the Silicatein Enzymes / P. Curnow, D. Kisailus, D.E. Morse // : *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2006. - V. 45. - P. 613-616.
- 40) **Dakhili, S. Y. T.** Recombinant silicateins as model biocatalysts in organosiloxane chemistry / S. Y. T. Dakhili, S. A. Caslin, A. S. Faponle, P. Quayle, S. P. de Visser, L. S. Wong // *PNAS.* - 2017. - P. E5285–E5291.
- 41) **Deluca, S.** Fully Flexible Docking of Medium Sized Ligand Libraries with RosettaLigand / S. Deluca, K. Khar, J. Meiler // *PLoS ONE.* - 2015. - V. 10.- N. 7. - P. E0132508.
- 42) **Depla, A.** ²⁹Si NMR and UV–Raman Investigation of Initial Oligomerization Reaction Pathways in Acid-Catalyzed Silica Sol–Gel Chemistry / A. Depla, D. Lesthaeghe, Titus S. Van Erp, A. Aerts, K. Houthoofd, F. Fan, C. Li, V. Van Speybroeck, M. Waroquier, C. E. A. Kirschhock, J. A. Martens // *J. Phys. Chem. C.* -

2011. - V. 115. - N. 9. - P. 3562-3571.
- 43) **Dubinsky, S.** Hybrid porous material produced by polymerization-induced phase separation / S. Dubinsky, A. Petukhova, I. Gourevich, E. Kumacheva // *Chem. Commun.* - 2010. - V. 46.- P. 2578–2580.
- 44) **Duin, A. C. T.** ReaxFFSiO Reactive Force Field for Silicon and Silicon Oxide Systems / A. C. T. Duin, A. Strachan, S. Stewman, Q. Zhang, X. Xu, W.A. Goddard // *J. Phys. Chem. A.* - 2003. - V. 107.- N. 19. - P. 3803–3811.
- 45) **Durak, G. M.** A role for diatom-like silicon transporters in calcifying coccolithophores / G. M. Durak, A. R. Taylor, C. E. Walker, I. Probert, C. de Vargas, S. Audic, D. Schroeder, C. Brownlee, G. L. Wheeler // *Nature Communications.*- 2016.- V. 7.- N. 10543- P. 1-12.
- 46) **Ebelmen, M.** Sur les Combinaisons des Acides Borique et Silicique Avec les Ethers/ M. Ebelmen // *Ann. Chi. Phys.* - 1846. - V. 16. - P. 129.
- 47) **Ehrlich, H.** Mineralization of the metre-long biosilica structures of glass sponges is templated on hydroxylated collagen / H. Ehrlich, R. Deutzmann, E. Brunner // *Nature Chem.* - 2010. - V. 2.- P. 1084–1088.
- 48) **Ekici, Ö. D.** Unconventional serine proteases: Variations on the catalytic Ser, His, Asp triad configuration / Ö. D. Ekici, M. Paetzel, R. E. Dalbey // *Protein Science.* - 2008.- V. 17.- P. 2023–2037.
- 49) **Ewald, P.** Die berechnung und elektrostatischer gitterpotentiale // *Ann. Phys.* - 1921. - V. 64. - P. 253Ä-287.
- 50) **Fairhead, M.** Crystal structure and silica condensing activities of silicatein alpha-cathepsin L chimeras / *ChemComm.* - 2008. - P. 1765-1767.
- 51) **Fairhead, M.** The Heavy-Light Chain Loop of Human Cathepsin-L Modulates Its Activity and Stability / M. Fairhead, C. F. van der Walle // *Protein & Peptide Letters.* - 2008. - V. 15. - N. 1. - P. 1-7.
- 52) **Feuston, B.P.** Oligomerization in silica sols / B. P. Feuston, S.H. Garofalini // *Journal of Physical Chemistry.* - 1990. - V. 94. - P. 5351-5356.
- 53) **Finger, L. W.** Systematics of High-Pressure Silicate Structures / L. W. Finger and

- R. M. Hazen // *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*. - 2000. - V. 41. - N. 1. - P. 123-155.
- 54) **Fodor, K.** Enzyme:substrate hydrogen bond shortening during the acylation phase of serine protease catalysis / K. Fodor, V. Harmat, R. Neutze, L. Szilagyi, L. Graf, G. Katona // *Biochemistry*. - 2006. - V. 45. - P. 2114–2121.
- 55) **Foster, N. C.** Dynamic 3D culture: models of chondrogenesis and endochondral ossification / N. C. Foster, J. R. Henstock, Y. Reinwald, A. J. El. Haj // *Embryo Today*. - 2015. - V. 105. - I. 1. - P. 19-33.
- 56) **Gais, H. J.** Activation of pig liver esterase in organic media with organic polymers: Application to the enantioselective acylation of racemic functionalized secondary alcohols / H. J. Gais, M. Jungen, V. Jadhav // *J. Org. Chem.* - 2001. - V. 66. - P. 3384–3396.
- 57) **Galeener, F. L.** Planar rings in vitreous silica / F.L. Galeener // *J. Non-Cryst. Solids*. - 1982. - V. 49. - P. 53-62.
- 58) **Gordon, M. S.** Advances in electronic structure theory: GAMESS a decade later. Theory and Applications of Computational Chemistry: the first forty years / M. S. Gordon, M. W. Schmidt // Elsevier. Amsterdam. - 2005. - P. 1167–1189.
- 59) **Görlich, S.** Natural hybrid silica/protein superstructure at atomic resolution/ S. Görlich, A. J. Samuel, R. J. Best, R. Seidel, J. Vacelet, F. K. Leonarski, T. Tomizaki, B. Rellinghaus, D. Pohl, I. Zlotnikov // *PNAS*. - 2020. - V. 117. - I. 49. - P. 31088-31093.
- 60) **Gröger, C.** Silicon uptake and metabolism of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*: Solid-state ²⁹Si NMR and fluorescence microscopic studies / C. Gröger, M. Sumper, E. Brunner // *J. Struct. Biol.* - 2008. - V. 161. - N. 1. - P. 55-63.
- 61) **Gunc, G.** Crystal structure of MHC class II-associated p41 Ii fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S / G. Gunc, G. Pungerc, I. Klemenc, V. Turk, D. Turk // *EMBO*. 1999. — V. 18. — N. 4. — P. 793–803.
- 62) **Hakansson, K.** The structure of aspartyl dipeptidase reveals a unique fold with a Ser-His-Glu catalytic triad / K. Hakansson, A. H. Wang, C. G. Miller // *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. - 2000. - V. 97. - P. 14097–14102.
- 63) **Halasz, I.** ²⁹Si NMR and Raman Glimpses into the Molecular Structures of Acid and Base Set Silica Gels Obtained from TEOS and Na-Silicate / I. Halasz, A. Kierys, J. Goworek, H. Liu, R. E. Patterson // *The Journal of Physical Chemistry C*. - 2011. - V. - 115. - N. 50. - P. 24788-24799.
- 64) **Hansena, A. L.** Measurement of histidine pKa values and tautomer populations in invisible protein states / A. L. Hansena, L. E. Kaya // *Plus Biophysics and Computational Biology*. - 2014. - V. 111. - N. 17. – P. 1705–1712.
- 65) **Harris, R. K.** Silicon-29 nuclear magnetic resonance studies of aqueous silicate solutions. Part 5. — First-order patterns in potassium silicate solutions enriched with silicon-29 / R. K. Harris, C. T. G. Knight // *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*. - 1983. - V. 79. - P. 1539-1561.
- 66) **Hassan, S. A.** Effects of electric fields on proton transport through water chains / S. A. Hassan, G. Hummer // *J. Chem. Phys.* - 2006.- V. 124.- I. 204510.- P. 1-8.
- 67) **Hedstrom, L.** Serine Protease Mechanism and Specificity / L. Hedstrom // *Chem. Rev.* - 2002. - V. 102. - P. 4501–4523.
- 68) **Hershko, A.** The ubiquitin system / A. Hershko, A. Ciechanover // *Annu Rev Biochem.* - 1998. - V. 67.- P. 425-479.
- 69) **Huff, N. T.** Factors affecting molecular dynamicssimulated vitreous silica structures / N.T. Huff, E. Demiralp, T. Cagin, W.A. Goddard // *J. Non-Cryst. Solids*.- 1999.- V. 253.- P. 133–142.
- 70) **Humphrey, W.** VMD - Visual Molecular Dynamics / W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten // *J. Molec. Graphics*. - 1996. - V. 14. - P. 33-38.
- 71) **Igarashi, M.** Non-aqueous selective synthesis of orthosilicic acid and its oligomers / M. Igarashi, T. Matsumoto, F. Yagihashi, H. Yamashita, T. Ohhara, T. Hanashima, A. Nakao, T. Moyoshi, K. Sato, S. Shimada // *Nat Commun*.- 2017.- Vol. 8.- I. 140.- P. 1-8.
- 72) **Ikeda, T.** Bacterial biosilicification: a new insight into the global silicon cycle / T. Ikeda // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. - 2021. - V. 85. - I. 6. - P. 1324–

- 1331.
- 73) **Iler, R. K.** The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry / R.K. Iler // The Chemistry of Silica. - 1979. - V. 95. - P. 328.
- 74) **Jafari, S.** Mesoporous silica nanoparticles for therapeutic diagnostic applications/S. Jafari,H. Derakhshankhah, L. Alaei, A. Fattahi, B. ShiriVarnamkhasti, A. A. Saboury // Biomedicine & Pharmacotherapy.- 2019.- V. 109.- P. 1100-1111.
- 75) **Jakob, F.** Surface charge engineering of a Bacillus gibsonii subtilisin protease / F. Jakob, R. Martinez, J. Mandawe, H. Hellmuth, P. Siegert, K. Maurer, U. Schwaneberg // Applied Microbiology and Biotechnology. - 2013. - V. 97. - I. 15. - P. 6793–6802.
- 76) **Jiang, P.** Silica Layer Used in Sensor Fabrication from aLow-Temperature Silane-Free Procedure / P. Jiang, Y. Chow, C. Chien, C. Chang, C. Lin // chemosensors.- 2021.- V. 9.- P. 32-41.
- 77) **Kaila, V. R. I.** Energetics of direct and water-mediated proton-coupled electron transfer / V. R. I. Kaila, G. Hummer // J. Am. Chem. Soc. - 2011.- V. 133.- I. 47.- P. 19040-19043.
- 78) **Kamenev, D. G.** Silicon Crystals Formation Using Silicatein-Like Cathepsin of Marine Sponge Latrunculia oparinae / D. G. Kamenev, Y. N. Shkryl, G. N. Veremeichik, V. A. Golotin, N. N. Naryshkina, Y. O. Timofeeva, S. N. Kovalchuk, I. V. Semiletova, V. P. Bulgakov // J. Nanosci Nanotechnol.- 2015.- V. 15.- I. 12.- P. 10046-10049.
- 79) **Keiler, K. C.** Tsp and related C-terminal proteases. In The enzymes, co- and posttranslational proteolysis of proteins / K. C. Keiler, R. T. Sauer // Academic Press, San Diego, CA. - 2001. - V. 22.- P. 373–386.
- 80) **Kelts, L. W.** A silicon-29 NMR study of the structural intermediates in low pH sol-gel reactions / L. W. Kelts, N. J. Armstrong // J. Mater. Res. - 1989. - V. 4. - P. 423.
- 81) **Khaskin, I. G.** Some Applications of Deuterium and Heavy Oxygen in Silicon Chemistry / I. G. Khaskin // Dokl. Akad. Nauk SSSR. - 1985. - V. 85. - P. 129.

- 82) **Kilambi, K. P.** Rapid calculation of protein pKa values using Rosetta / K. P. Kilambi, J. J. Gray // *Biophysical Journal*. - 2012. - V. 103. - N. 3. - P. 587-595.
- 83) **Kim, D. E.** Protein structure prediction and analysis using the Robetta server / D. E. Kim, D. Chivian, D. Baker // *Nucleic Acids Res.*- 2004.- V. 32.- P. W526–W531.
- 84) **Kim, S. J.** Integrative Structure-Function Mapping of the Nucleoporin Nup133 Suggests a Conserved Mechanism for Membrane Anchoring of the Nuclear Pore Complex / S. J. Kim, J. Fernandez-Martinez, P. Sampathkumar, A. Martel, T. Matsui, H. Tsuruta, T. M. Weiss, Y. Shi, A. Markina-Inarrairaegui, J. B. Bonanno, J. M. Sauder, S. K. Burley, B. T. Chait, S. C. Almo, M. P. Rout, A. Sali // *Molecular & Cellular Proteomics*. - 2014. - V. 13. - N. 11. - P. 2911-2926.
- 85) **Kirschke, H.** Cathepsin, L. A new proteinase from rat-liver lysosomes / H. Kirschke, J. Langner, B. Wiederanders, S. Ansorge, P. Bohley // *Eur. J. Biochem.* - 1977. - V. 74. - P. 293–301.
- 86) **Kisailus, D.** Enzymatic synthesis and nanostructural control of gallium oxide at low temperature / D. Kisailus, J. H. Choi, J. C. Weaver, W. J. Yang, D. E. Morse // *Adv. Mater.* - 2005. - V. 17. - P. 314.
- 87) **Knight, C. T. G.** 17O Nuclear Magnetic-Resonance Spectroscopic Studies of Aqueous Alkaline Silicate Solutions / C. T. G. Knight, A. R. Thompson, A. C. Kunwar, H. S. Gutowsky, E. Oldfield, R. J. Kirkpatrick // *J. Chem. Soc.* - 1989. - P. 275-281.
- 88) **Knight, C. T. G.** The Structure of Silicate Anions in Aqueous Alkaline Solutions / C. T. G. Knight, R. J. Balec, S. D. Kinrade // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2007. - V. 46. - I. 43. - P. 8148–8152.
- 89) **Kossiakoff, A. A.** Direct determination of the protonation states of aspartic acid-102 and histidine-57 in the tetrahedral intermediate of the serine proteases: Neutron structure of trypsin / A. A. Kossiakoff, S. A. Spencer // *Biochemistry*. - 1981. - V. 20. - P. 6462–6474.
- 90) **Kozuch, S.** DSD-PBEP86: In search of the best double-hybrid DFT with spin-component scaled MP2 and dispersion corrections / S. Kozuch, J. M. L. Martin // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2011. - V. 13. - P. 20104-20107.

- 91) **Krasko, A.** Expression of silicatein and collagen genes in the marine sponge *Suberites domuncula* is controlled by silica and myotrophin / A. Krasko, B. Lorenz, R. Batel, H. C. Schröder, I. M. Müller, W. E. Müller // *Eur. J. Biochem.* - 2000. - V. 267. N.- 15.- P. 4878-4887.
- 92) **Krom, M. D.** Silica cycling in the ultra-oligotrophic eastern Mediterranean Sea / M. D. Krom, N. Kress, K. Fanning // *Biogeosciences.* - 2014.- V. 11.-P. 4211–4223.
- 93) **Laurrabaquio, G. L.** Generation and study of a relatively large amorphous silica surface in the liquid phase / G. L. Laurrabaquio, M. E. F. Garcia, J. M. M. Carrizales, D. M. Martinez, C. D. Torrejon // *Journal Molecular Simulation.* - 2019. - V. 45. - N. 7. - P. 595-602.
- 94) **Lazaro, A.** Synthesis, Polymerization, and Assembly of Nanosilica Particles below the Isoelectric Point / A. Lazaro, N. Vilanova, L. D. B. Torres, G. Resoort, I. K. Voets, H. J. H. Brouwers // *Langmuir.* - 2017. - V. 33. - N. 51. - P. 14618–14626.
- 95) **Lee, H. S.** BSP-SLIM: A blind low-resolution ligand-protein docking approach using theoretically predicted protein structures / H. S. Lee, Y. Zhang // *Proteins.* - 2012. - V. 80. - P. 93-110.
- 96) **Liang, M.** Imidazole catalyzed silica synthesis: Progress toward understanding the role of histidine in (bio)silicification / M. Liang, S. V. Patwardhan, E. N. Danilovtseva, V. V. Annenkov, C. C. Perry // *J. Mater. Res.* - 2009. - V. 24. - N. 5. - P. 1700- 1708.
- 97) **Liu, J.** Cathepsin L function in insect moulting: molecular cloning and functional analysis in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* / J. Liu, G. P. Shi, W. Q. Zhang, G. R. Zhang, W. H. Xu // *Insect Mol Biol.* - 2006. - V. 15. - N. 6. - P. 823-834.
- 98) **Lyskov, S.** Serverification of Molecular Modeling Applications: The Rosetta Online Server That Includes Everyone (ROSIE) / S. Lyskov, F. C. Chou, S. Ó. Conchúir, B. S. Der, K. Drew, D. Kuroda, J. Xu, B. D. Weitzner, P. D. Renfrew, P. Sripakdeevong, B. Borgo, J. J. Havranek, B. Kuhlman, T. Kortemme, R. Bonneau, J. J. Gray, R. Das // *PLoS One.* - 2013. - V. 8.- N. 5. - P. e63906. doi: 10.1371/journal.pone.0063906.
- 99) **Maldonado, M.** Intra-epithelial spicules in a homosclerophorid sponge / M. Maldonado, A. Riesgo // *Cell Tissue Res.* - 2007. - V. 328. - N. 3. - P. 639-650.

- 100) **Marvin** 5.0.0, 40 ChemAxon. [Электронный ресурс]. – 2021. – Режим доступа: <http://www.chemaxon.com> – Дата доступа: 12.06.2021.
- 101) **Marx, D.** Ab initio Molecular Dynamics: Theory and Implementation, in Modern Methods and Algorithms of Quantum Chemistry / Marx D., J. Hutter // Forschungszentrum Jülich. - 2000. - V. 1. - P. 301-449.
- 102) **Miertuš, S.** Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of AB initio molecular potentials for the prediction of solvent effects. Chemical Physics / S. Miertuš, E. Scrocco, J. Tomasi // Chemical Physics. - 1981. - V. 55. - P. 117-129.
- 103) **Mishin, A.** An outlook on using serial femtosecond crystallography in drug discovery / A. Mishin, A. Gusach, A. Luginina, E. Marin, V. Borshchevskiy, V. Cherezov // Expert Opinion on Drug Discovery. - 2019. - V. 14. - I. 9. - P. 933-945.
- 104) **Miyake, T.** Grotthuss mechanisms: from proton transport in proton wires to bioprotonic devices / T. Miyake, M. Rolandi // Journal of Physics: Condensed Matter.- 2016.- V. 28.- I. 023001.- P. 1-18.
- 105) **Mohammadian, M.** Synthesis and characterization of silica aerogel as a promising drug carrier system / M. Mohammadian, T. S. J. Kashi, M. Erfan, F. P. Soorbaghid // Journal of Drug Delivery Science and Technology. - 2018. - V. 44. - P. 205-212.
- 106) **Mönttinen, H. A. M.** Structural comparison strengthens the higher-order classification of proteases related to chymotrypsin / H. A. M. Mönttinen, J. J. Ravantti, M.M. Poranen // PLOS.- 2019.
- 107) **Moqadam, M.** A test on reactive force fields for the study of silica dimerization reactions / M. Moqadam, E. Riccardi, T. T. Trinh, P. Astrand, T. S. Erp // The Journal of Chemical Physics. - 2015.- V. 143. - P. 184113-184121.
- 108) **Morse, D. E.** Silicon biotechnology: harnessing biological silica production to construct new materials / D. E. Morse // Tibtech June.- 1999.- V. 17.- P. 230 — 232.
- 109) **Mozzi, R. L.** The structure of vitreous silica / R. L. Mozzi, B. E. Warren // J. Appl. Cryst. - 1969. - V. 2. - P. 164-172.

- 110) **Müller, W. E. G.** Siliceous spicules in marine demosponges (example *Suberites domuncula*) / W. E. G. Müller, S. I. Belikov, W. Tremel, C. C. Perry // *Micron*. - 2006. - V. 37. - P. 107-120.
- 111) **Müller, W. E.** A cryptochrome-based photosensory system in the siliceous sponge *Suberites domuncula* (Demospongiae) / W. E. Müller, X. H. Wang, H. C. Schröder, M. Korzhev, V. Grebenyuk, J. Markl, K. P. Jochum, D. Pisignano, M. Wiens // *FEBS J.* - 2010. - V. 277. - P. 1182–1201.
- 112) **Müller, W. E.** Bioorganic/inorganic hybrid composition of sponge spicules: matrix of the giant spicules and of the comitalia of the deep sea hexactinellid / W.E.Müller // *Monorhaphis J. Struct. Biol.* - 2008. - V. 161. - P. 188–203.
- 113) **Müller, W. E.** Dissection of the structure-forming from the structure-guiding activity of silicatein: a biomimetic molecular approach to print optical fibers / W. E. Müller, T. Link, H. C. Schröder, M. Korzhev, M. Neufurth, D. Brandt, X. H. Wang // *J. Mater. Chem.* - 2014.- V. 2.- P. 5368–5377.
- 114) **Müller, W. E.** Fractal-related assembly of the axial filament in the demosponge *Suberites domuncula*: relevance to biomineralization and the formation of biogenic silica / W. E. Müller, A. Boreiko, U. Schloßmacher, X. H. Wang, M. N. Tahir, W. Tremel, D. Brandt, J. A. Kaandorp, H. C. Schröder // *Biomaterials*. - 2007. - V. 28. - P. 4501–4511.
- 115) **Müller, W. E.** Hardening of bio-silica in sponge spicules involves an aging process after its enzymatic polycondensation: evidence for an aquaporin- mediated water absorption / W. E. Müller, X. H. Wang, M. Wiens, U. Schloßmacher, K. P. Jochum, H. C. Schröder // *Biochim. Biophys. Acta*. - 2011. - V. 1810. - P. 713–726.
- 116) **Müller, W. E.** Identification of a silicatein (-related) protease in the giant spicules of the deep-sea hexactinellid / W. E. Müller, A. Boreiko, U. Schlossmacher, X. Wang, C. Eckert, K. Kropf, J. Li, H. C. Schröder // *Monorhaphis chuni J. Exp. Biol.* - 2008. - V. 211. - P. 300–309.
- 117) **Müller, W. E.** Interaction of the retinoic acid signaling pathway with spicule formation in the marine sponge *Suberites domuncula* through activation of bone

- morphogenetic protein-1 / W. E. Müller, M. Binder, J. von Lintig, Y. W. Guo, X. H. Wang, J. A. Kaandorp, M. Wiens, H. C. Schröder // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2011. - V. 1810. - P. 1178–1194.
- 118) **Müller, W. E.** Luciferase a light source for the silica-based optical waveguides (spicules) in the demosponge *Suberites domuncula* / W. E. Müller, M. Kasueske, X. H. Wang, H. C. Schröder, Y. Wang, D. Pisignano, M. Wiens // *Cell. Mol. Life Sci.* - 2009. - V. 66. - P. 537-553.
- 119) **Müller, W. E.** NanoSIMS: insights into the organization of the proteinaceous scaffold within hexactinellid sponge spicules / W. E. Müller, X. Wang, B. Sinha, M. Wiens, H. C. Schröder, K. P. Jochum // *Chem. Bio. Chem.* - 2010. - V. 11. - P. 1077–1082.
- 120) **Müller, W. E.** Silicateins: a paradigm shift in bioinorganic chemistry, enzymatic synthesis of inorganic polymeric silica / W. E. Müller, H. C. Schröder Z. Burghard, D. Pisignano, X. H. Wang //: *Chem. Eur. J.* - 2013. - V. 19. - P. 5790-5804.
- 121) **Müller, W. E.** Siliceous spicules in marine demosponges (example *Suberites domuncula*) / W. E. Müller, S. I. Belikov, W. Tremel, C. C. Perry, W. W. Grieskes, A. Boreiko, H. C. Schoder //: *Micron.* - 2006. - V. 37. - P. 107-120.
- 122) **Müller, W. E.** The silicatein-propeptide acts as inhibitor/modulator of self-organization during spicule axial filament formation / W. E. Müller, H. C. Schröder, S. Muth, S. Gietzen, M. Korzhev, V. Grebenjuk, M. Wiens, U. Schloßmacher, X. H. Wang // *FEBS J.* - 2013. - V. 280.- P. 1693–1708.
- 123) **Murr, M. M.** Fractal intermediates in the self-assembly of silicatein filaments / M. M. Murr, D. E. Morse // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* - 2005. - V. 102. - P. 11657–11662.
- 124) **Neese, F.** Software update: the ORCA program system, version 4.0, Wiley Interdiscip / F. Neese // *Rev. Comput. Mol. Sci.* - 2017. - V. 8. - P. E1327.
- 125) **NetworkX** - Network analysis in Python - 2020 URL: <https://networkx.org/>Дата доступа: 12.06.2021.
- 126) **Newell, R. G.** The structure of sodium trisilicate glass via molecular dynamics

- employing three-body potentials / R. G. Newell, B. P. Feuston, S. H. Garofalini // *J. Mater. Res.* - 1989.- V. 4. - P. 434-439.
- 127) **Nilsson, E. J.** Stability and behaviour in aqueous solutions of the anionic cubic silsesquioxane substituted with tetramethylammonium / E. J. Nilsson, M. Huber, G. Carlström, O. Söderman, D. T. Bowron, K. J. Edlerad, V. Alfredssona / *Phys. Chem. Chem. Phys.*- 2019. - V. 21. - P. 6732-6742.
- 128) **Nosenko, T.** Deep metazoan phylogeny: when different genes tell different stories/ T. Nosenko, F. Schreiber, M. Adamska, M. Adamski, M. Eitel, J. Hammel, M. Maldonado, W. E. G. Müller, M. Nickel, B Schierwater // *Mol. Phylogenet. EV.* - 2013. - V. 67.- P. 223–233.
- 129) **Otzen, D.** The role of proteins in biosilification / D. Otzen // *Scientifica.* - 2012. - P. 867562.
- 130) **Paetzel, M.** Signal peptidases / M. Paetzel, A. Karla, N.C. Strynadka, R.E. Dalbey // *Chem. Rev.* - 2002. - V. 102. - P. 4549–4580.
- 131) **Paetzel, M.** UmuD and UmuD9 proteins / M. Paetzel, R. Woodgate // Elsevier Academic Press, London, UK. - In *Handbook of proteolytic enzymes*, 2nd ed. - 2004. - P. 1976–1981.
- 132) **Patwardhan, S. V.** Silicification and biosilicification: Part 6. Poly-L-Histidine mediated synthesis of silica at neutral pH. / S. V. Patwardhan, S. J. Clarson // *J. Inorg. Organomet. Polym.* - 2003. - V. 13. - P. 49.
- 133) **Pavlova, A.** Clarifying the role of sodium in the silica oligomerization reaction / A. Pavlova, T. T. Trinh, R. A. van Santenc, E. J. Meijer // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2013. - V. 15. - P. 1123-1129.
- 134) **Pereira, J. C.** Silica condensation reaction: an ab initio study / J. C. Pereira, C.R.A. Catlow, G. D. Price // *Chem. Commun.* - 1998. - P. 1387-1388.
- 135) **Perry, C.** Biosilicification: The role of the organic matrix in structure control / C. Perry // *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry.* - 2000. - V. 5. - P. 537-550.
- 136) **Petitgirard, S.** Magma properties at deep Earth's conditions from electronic

- structure of silica/S. Petitgirard, C. J. Sahle, C. Weis, K. Gilmore, G. Spiekermann, J. S. Tse, M. Wilke, C. Cavallari, V. Cerantola, C. Sternemann // *Geochem. Persp. Let.* - 2019. - V. 9. - P. 32-37. DOI: 10.7185/geochemlet.1902
- 137) **Phillips, J. C.** Scalable Molecular Dynamics with NAMD / J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kalé, K. Schulten // *J. Comput. Chem.* - 2005.- V. 26.- N. 16.- P.1781–1802.
- 138) **Pilgrim, C. D.** ²⁹Si NMR of aqueous silicate complexes at gigapascal pressures / C. D. Pilgrim, C. A. Colla, G. Ochoa, J. H. Walton, W. H. Casey // *Communications in Chemistry*. - 2018. - N. 67. - P. 1-6.
- 139) **Pitman, M. C.** Dynamics of Confined Reactive Water in Smectite Clay&Zeolite Composites / M. C. Pitman, A. C. T. Duin // *J. Am. Chem. Soc.* - 2012. - V. 134. - P. 3042-3053.
- 140) **Plimpton, S.** Fast Parallel Algorithms for Short-Range Molecular Dynamics / S. Plimpton // *J. Comp. Phys.* - 1995. - V. 117. - P. 1-19.
- 141) **Polini, A.** Optical properties of in-vitro biomineralised silica / A. Polini, S. Pagliara, A. Camposeo, R. Cingolani, X. Wang, H. C. Schröder W. E. G. Müller, D. Pisignano // *Scientific Reports*. - 2012. - V. 607.
- 142) **Poorani, G.** A systematic reconsideration on proteases / G. Poorani, A. Kamalini, R. Baskar // *International Journal of Biological Macromolecules*. - 2019. - V. 128. - P. 254-267.
- 143) **Povarova, N. V.** Efficient silica synthesis from tetra(glycerol)orthosilicate with cathepsin- and silicatein-like proteins / N. V. Povarova, N. A. Barinov, M. S. Baranov, N. M. Markina, A. M. Varizhuk, G. E. Pozmogova, D. V. Klinov, V. B. Kozhemyako, K. A. Lukyanov // *Scientific Reports*.- 2018.- V. 8.- N. 16759.- P. 1-9.
- 144) **Preari, M.** Bioinspired Insights into Silicic Acid Stabilization Mechanisms: The Dominant Role of Polyethylene Glycol-Induced Hydrogen Bonding / M. Preari, K. Spinde, J. Lazic, E. Brunner, K. D. Demadis // *J. Am. Chem. Soc.*- 2014.- V. 136.- I. 11.- P. 4236–4244.
- 145) **Puente, X. S.** A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic

- systems / X. S. Puente, L. M. Sanchez, A. Gutierrez-Fernandez, G. Velasco, C. Lopez-Otin // *Biochem. Soc. Trans.* - 2005. - V. 33. - P. 331–334.
- 146) **Python** [Электронный ресурс]. – 2021. – Режим доступа: <https://www.python.org/> – Дата доступа: 12.06.2021.
- 147) **Ramesh, R.** Quest for Novel Chemical Entities through Incorporation of Silicon in Drug Scaffolds / R. Ramesh, D. S. Reddy // *J. Med. Chem.* - 2018. - V. 61. - I. 9. - P. 3779–3798.
- 148) **Rao, N. Z.** Molecular Dynamics Simulations of the Polymerization of Aqueous Silicic Acid and Analysis of the Effects of Concentration on Silica Polymorph Distributions, Growth Mechanisms, and Reaction Kinetics / N. Z. Rao, L. D. Gelb // *J. Phys. Chem. B.* - 2004. - V. 108. - P. 12418-12428.
- 149) **Rawlings, N. D.** The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database / N. D. Rawlings, A. J. Barrett, P. D. Thomas, X. Huang, A. Bateman, R. D. Finn // *Nucleic Acids Res.* - 2018. - V. 46. - P. D624-D632.
- 150) **Riesgo, A.** A Proposal for the Evolution of Cathepsin and Silicatein in Sponges / A. Riesgo, M. Maldonado, S. Lopez-Legentil, G. Giribet // *Journal of Molecular Evolution.* - 2015. - V. 80. - N. 5. - P. 278–291.
- 151) **Rimsza, J. M.** Nanoporous silica gel structures and evolution from reactive force field-based molecular dynamics simulations / J. M. Rimsza, J. Du // *npj Materials Degradation.* - 2018. - V. 2. - N. 18. - P.
- 152) **Rimsza, J. M.** Interfacial Structure and Evolution of the Water&Silica Gel System by Reactive Force-Field-Based Molecular Dynamics Simulations / J. M. Rimsza, J. Du // *J. Phys. Chem.* - 2017. - V. 121. - P. 11534-11543.
- 153) **Rimsza, J. M.** Water Interactions with Nanoporous Silica: Comparison of ReaxFF and ab Initio based Molecular Dynamics Simulations / J. M. Rimsza, J. Yeon, A. C. T. van Duin, J. Du // *J. Phys. Chem. C.* - 2016. - V. 120. - N. 43. - P. 24803-24816.
- 154) **Robillard, G.** High resolution nuclear magnetic resonance studies of the active site of chymotrypsin. II. Polarization of histidine 57 by substrate analogues and

- competitive inhibitors / G. Robillard, R. G. Shulman // *J. Mol. Biol.* - 1974. - V. 86. - P. 541–558.
- 155) **Rodriguez-Franco, E. J.** Dysregulation of macrophage-secreted cathepsin B contributes to HIV-1-linked neuronal apoptosis / E. J. Rodriguez-Franco, Y. M. Cantres-Rosario, M. Plaud-Valentin, R. Romeu, Y. Rodríguez, R. Skolasky, V. Meléndez, C. L. Cadilla, L. M. Melendez // *PLoS One.* - 2012. - V. 7. - N. 5. - P. e36571.
- 156) **Roques-Carmes, T.** Reflectometric study of the adsorption of poly(vinylimidazole) on a gold electrode, effects of pH, and applied potential / T. Roques-Carmes, F. Membrey, M. Kaisheva, C. Filiâtre, A. Foissy // *J. Colloid Interface Sci.* - 2006. - V. 299. - P. 504.
- 157) **Rösch, L.** Silicon compounds, organic / L. Rösch, P. John, R. Reitmeier // *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.* - 2002. - V. 32.- P. 637.
- 158) **Rücker, C.** Environmental chemistry of organosiloxanes / C. Rücker, K. Kümmerer // *Chem Rev.* - 2015. - V. 115. - P. 466–524.
- 159) **Sakka, S.** The sol-gel transition in the hydrolysis of metal alkoxides in relation to the formation of glass fibers and films / S. Sakka, K. Kamiya // *J. Non-Cryst. Solids.* - 1982. - V. 48. - P. 31
- 160) **Salna, B.** Tunneling Kinetics and Nonadiabatic Proton-Coupled Electron Transfer in Proteins: The Effect of Electric Fields and Anharmonic Donor–Acceptor Interactions / B. Salna, A. Benabbas, D. Russo, P. M. Champion // *J. Phys. Chem. B.* - 2017.- V. 121.- I. 28.- P. 6869–6881.
- 161) **Sarai, N. S.** Biocatalytic Transformations of Silicon - the Other Group 14 Element / N. S. Sarai, B. J. Levin, J. M. Roberts, D. E. Katsoulis, F. H. Arnold // *ACS Cent. Sci.* - 2021. - V. 6. - P. 944–953. DOI: 10.1021/acscentsci.1c00182.
- 162) **Schröder, H. C.** Co-Expression and functional interaction of silicatein with galectin: matrix-guided formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula* / H. C. Schröder, A. Boreiko, M. Korzhev, M. N. Tahir, W. Tremel, C. Eckert, H. Ushijima, I. M. Müller, W. E. Müller // *J. Bio. Chem.* - 2006. -

- V. 281.- P. 12001-12009.
- 163) **Schröder, H. C.** Hierarchical architecture of sponge spicules biocatalytic and structure-directing activity of silicatein proteins as model for bioinspired applications / H. C. Schröder, V. A. Grebenjuk, X. Wang, W. E. Müller // *Bioinspiration & Biomimetics*. - 2016. - V. 11. - P. 041002.
- 164) **Schröder, H. C.** Silicatein: acquisition of structure-guiding and astructure-forming properties during maturation from the pro-silicatein to the silicatein form / H. C. Schröder, X. H. Wang, A. Manfrin, S. H. Yu, V. A. Grebenjuk, M. Korzhev, M. Wiens, U. Schloßmacher, W. E. G. Müller // *J. Biol. Chem.* - 2012. - V. 287. - P. 22196–22205.
- 165) **Shimizu, K.** Glassin, a histidine-rich protein from the siliceous skeletal system of the marine sponge *Euplectella*, directs silica polycondensation / K. Shimizu, T. Amano, M. R. Bari, J. C. Weaver, J. Arima, N. Mori // *Proc. Natl Acad. Sci.* - 2015. - V. 112. - P. 11449–11454.
- 166) **Shimizu, K.** Silicatein alpha: cathepsin L-like protein in sponge biosilica / K. Shimizu, J. Cha, G. D. Stucky, D. E. Morse // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1998. - V. 95. - P. 6234–6238.
- 167) **Shkryl, Y. N.** Biomimetic Synthesis of Nanosized Silica Structures on a Substrate with Silicatein / Y. N. Shkryl, I. V. Semiletova, A. V. Nepomnyaschiy, S. N. Kovalchuk, G. N. Veremeichik, T. V. Avramenko, V. P. Bulgakov, Y. A. Shchipunov, S. S. Voznesenskiy, V. B. Kozhemyako // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*.- 2018.- V. 44.- N. 4.- P. 469-471.
- 168) **SIESTA 3.2.** [Электронный ресурс]. – 2002. – Режим доступа: <http://www.uam.es/siesta> – Дата доступа: 12.06.2021.
- 169) **Simpson, T. L.** Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems / T.L. Simpson, B.E. Volcani //Springer-Verlag New York.- 1981.- 587 с.
- 170) **Sjöberg, S. J.** Enhancement of silicate solubility by use of “green” additives: linking green chemistry and chemical water treatment / S. J. Sjöberg // *Non-Cryst. Solids*.- 1996.- V. 196. - P. 51-57.

- 171) **Slilaty, S. N.** Lysine-156 and serine-119 are required for LexA repressor cleavage: A possible mechanism / S. N. Slilaty, J. W. Little // Proc. Natl. Acad. Sci.- 1987. - V. 84. - P. 3987–3991.
- 172) **Smith, S. M.** Activity and Deletion analysis of recombinant Human cathepsin L expressed in Escherichia coli / S. M. Smith, M. M. Gottesman // J. Bio. Chem. - 1989. - V. 264. - N. 34. - P. 20487-20495.
- 173) **Soler, J. M.** The SIESTA method for ab initio order-N materials simulation / J. M. Soler, E. Artacho, J.D. Gale, A. Garcia, J. Junquera, P. Ordejon, D. Sanchez-Portal // Journal of Physics: Condensed Matter. - 2002. - V. 14. - N. 11. - P. 2745-2767.
- 174) **Soper, A. K.** Hydrogen-Hydrogen Pair Correlation Function in Liquid Water / A. K. Soper, R. N. Silver // Phys. Rev. Lett. - 1982. - V. 49. - P. 471.
- 175) **Sparkes, E. I.** Improved Production and Biophysical Analysis of Recombinant Silicatein- α / E. I. Sparkes, R. A. Kettles, C. S. Egedezu, N. L. Stephenson, S. A. Caslin, S. Y. T. Dakhili, L. S. Wong // Biomolecules.- 2020.- V. 10.- N. 9.- N. 1209.- P. 1-17.
- 176) **Gromacs-3.3.1** [Электронный ресурс]. – 2021. – Режим доступа: www.gromacs.org – Дата доступа: 12.06.2021.
- 177) **Srivastava, D. J.** Correlating geminal 2J(Si–O–Si) couplings to structure in framework silicates / D. J. Srivastava, P. Florian, J. H. Baltisberger, P. J. Grandinetti // Phys. Chem. Chem. Phys. - 2018. - V. 20. - P. 562-571.
- 178) **Stepankova, V.** Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents / V. Stepankova, S. Bidmanova, T. Koudelakova, Z. Prokop, R. Chaloupkova, J. Damborsky // ACS Catal. - 2013. - V. 3. - P. 2823–2836.
- 179) **Stillinger, F. H.** Computer simulation of local order in condensed phases of silicon / F. H. Stillinger, T. A. Weber // Phys. Rev. - 1985. - V. 31. - P. 5262.
- 180) **Stober, W.,** Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range / W. Stober, A. Fink, E. Bohn, J. Coll // Int. Sci. - 1968. - V. 26. - P. 62-69.
- 181) **Sun, H.** Enabling materials informatics for ^{29}Si solid-state NMR of crystalline materials / H. Sun, S. Dwaraknath, H. Ling, X. Qu, P. Huck, K. A. Persson, S. E.

- Hayes // *npj Computational Materials*. - 2020. - V. 6. - I. 53.
- 182) **Szóri-Dorogházi, E.** Analyses of the Large Subunit Histidine-Rich Motif Expose an Alternative Proton Transfer Pathway in [NiFe] Hydrogenases / E. Szóri-Dorogházi, G. Maróti, M. Szóri, A. Nyilasi, G. Rákhely, K. L. Kovács // *PLoS ONE*.- 2012.- V. 7.- I. 4. - P. e34666 - e34677.
- 183) **Tahir, M. N.** Formation of layered titania and zirconia catalysed by surface-bound silicatein / M. N. Tahir, P. Théato, W. E. G. Müller, H. C. Schröder, A. Borejko, S. Faiss, A. Janshoff, J. Huth, W. Tremel // *Chem. Commun.* - 2005. - P. 5533.
- 184) **Tahir, M.N.** Monitoring the formation of biosilica catalysed by histidine-tagged silicatein / M. N. Tahir, P. Théato, W. E. G. Müller, H. C. Schröder, A. Janshoff, J. Zhang, J. Huth, W. Tremel // *Chem. Commun.* - 2004. - P. 2848.
- 185) **Tanizawa, K.** Comparison of deacylation rates of chymotryptic catalysis within an enantiomeric pair of p-nitrophenyl esters / K. Tanizawa, H. Yamada, K. Itoh, Y. Kanaoka // *Chem. Pharm. Bull.* - 1991. - V. 39. - P. 2748–2749.
- 186) **Tian, N.** Salivary gluten degradation and oral microbial profiles in healthy individuals and celiac disease patients / N. Tian, L. Faller, D. A. Leffler, C. P. Kelly, J. Hansen, J. A. Bosch, G. Wei, B. J. Paster, D. Schuppan, E. J. Helmerhorst // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2017. - V. 83. - N. 6. - P. e03330-e03316.
- 187) **Tielens, F.** Density Functional Theory Study of the Conformation and Energetics of Silanol and Disiloxane / F. Tielens, D. F. Proft, P. Geerlings // *J. Mol. Struct.: Theochem.* - 2001. - V. 542. - P. 227–237.
- 188) **Tossell, J. A.** Theoretical study on the dimerization of Si(OH)₄ in aqueous solution and its dependence on temperature and dielectric constant / J. A. Tossell // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. - 2005. - V. 69. - P. 283-291.
- 189) **Tréguer, P.** The Silica Balance in the World Ocean: A Reestimate / P. Tréguer, D. M. Nelson, A. J. Van Bennekom, B. Quéguiner // *Science*.- 1995.- V. 268. I. 5209.- pp. 375-379.
- 190) **Trinh, T. T.** Effect of counter ions on the silica oligomerization reaction /T. T. Trinh, A. P. J. Jansen, R. A. van Santen, J. Vande-Vondele, E. J. Meijer // *Chem. Phys.*

- Chem. - 2009. - V. 10. - P. 1775–1782.
- 191) **Trinh, T. T.** Mechanism of Oligamerization reactions of silica / T. T. Trinh, A. P. J. Jansen, R. A. Santen // *J. Phys. Chem.* - 2006. - V. 110. - N. 46. - P. 23099-23106.
- 192) **Trinh, T. T.** The role of water in silicate oligomerization reaction / T. T. Trinh, A. P. J. Jansen, R. A. van Santen, E. J. Meijer // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2009. - V. 11. - P. 5092– 5099.
- 193) **Turk, V.** Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities / V. Turk, B. Turk, D. Turk // *EMBO J.* - 2001. - V. 20. - N. 17. - P. 4629-4633.
- 194) **Urban, S.** The rhomboid protease family: a decade of progress on function and mechanism / S. Urban, S. W. Dickey // *Genome Biology.* - 2011. - V. 12. - p. 231-241.
- 195) **Uriz, M. J.** Siliceous spicules and skeleton frameworks in sponges: origin, diversity, ultrastructural patterns and biological functions / M. J. Uriz, X. Turon, M. A. Bacerro, G. Agell // J.C. Weaver, D.E. Morse // *Microsc. Res. Tech* - 2003. - V. 62. - P. 279-299.
- 196) **Vera, M. H.** Rotationally inelastic collisions of H⁺ ions with He buffer gas: Computing cross sections and rates / M. H. Vera, F. A. Gianturco, R. Wester, H. da S Jr., O. Dulieu, S. Schiller // *J. Chem. Phys.* - 2017. - V. 146. - P. 124310 — 124324.
- 197) **Veremeichik, G. N.** Occurrence of a Silicatein Gene in Glass Sponges (Hexactinellida: Porifera) / G. N. Veremeichik, Y. N. Shkryl, V. P. Bulgakov, S. V. Shedko, V. B. Kozhemyako, S. N. Kovalchuk, V. B. Krasokhin, Y. N. Zhuravlev, Y. N. Kulchin // *Mar. Biotechnol.* - 2011. - V. 13. - P. 810–819. DOI: 10.1007/s10126-010-9343-6.
- 198) **Wang, J.** How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? // J. Wang, P. Cieplak, P. A. Kollman / *J. Comp. Chem.* – 2000. – V. 21. - N. 12. – P. 1049-1074.
- 199) **Wang, S. F.** Bioactive and biodegradable silica biomaterial for bone regeneration / S. F. Wang, X. H. Wang, F. G. Draenert, O. Albert, H. C. Schröder, V. Mailänder, G.

- Mitov, W. E. Müller // *Bone*. - 2014. - V. 67. - P. 292–304.
- 200) **Wang, X. H.** Bio-silica and bio-polyphosphate: applications in biomedicine (bone formation) / X. H. Wang, H. C. Schröder, M. Wiens, H. Ushijima, W. E. Müller // *Curr. Opin. Biotechnol.* - 2012. - V. 23. - P. 570–578.
- 201) **Wang, X. H.** Giant siliceous spicules from the deep-sea glass sponge. *Monorhaphis chuni*: morphology, biochemistry and molecular biology / X. H. Wang, H. C. Schröder, W. E. Müller // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* - 2009. - V. 273. - P. 69–115.
- 202) **Wang, X.** Morphology of sponge spicules: silicatein a structural protein for bio-silica formation / X. Wang, M. Wiens, H. C. Schröder, S. Hu, E. Mugnaioli, U. Kolb, W. Tremel, D. Pisignano, W. E. Müller // *Adv. Eng. Biomater. Adv. Eng. Mater.* - 2010. - V. 12. - P. B422–B437.
- 203) **Wang, X. H.** Silicateins, silicatein interactors and cellular interplay in sponge skeletogenesis, formation of glass fiber-like spicules / X. H. Wang, U. Schlossmacher, M. Wiens, R. Batel, H. C. Schroder, W. E. Müller // *FEBS J.* - 2012. - V. 279. - P. 1721-1736.
- 204) **Wang, X.** Enzyme-based biosilica and biocalcite: biomaterials for the future in regenerative medicine / X. Wang, H. C. Schröder, W. E.G. Müller // *Trends in Biotechnology*.- 2014.- V. 32.- I. 9.- P. 441-447.
- 205) **Warring, S. L.** Surficial siloxane-to-silanol interconversion during room-temperature hydration/dehydration of amorphous silica films observed by ATR-IR and TIR-Raman spectroscopy / S.L. Warring, D.A. Beattie, A.J. McQuillan // *Langmuir*.- 2016.- V. 32.- N. 6. P. 1568–1576.- doi: 10.1021/acs.langmuir.5b04506.
- 206) **Weaver, J. C.** Molecular biology of demosponge axial filaments and their roles in biosilicification / J. C. Weaver, D. E. Morse // *Micron*. - 2003. - V. 62. - P. 356-367.
- 207) **Weg, M.** Poly(silicate)-metabolizing silicatein in siliceous spicules and silicasomes of demosponges comprises dual enzymatic activities (silica-polymerase and silica-esterase) / M. Weg, U. Schlossmacher, X. H. Wang, A. Boreiko, D. Brant, S. E. Wolf, W. Tremel, H.C. Schroder // *FEBS J.* - 2008. - V. 275.- P. 362-370.
- 208) **Wiens, M.** Flashing light signaling circuit in sponges: endogenous light generation

- after tissue ablation in *Suberites domuncula* / M. Wiens, X. H. Wang, A. Unger, H. C. Schröder, V. Grebenjuk, D. Pisignano, K. Jochum, W. E. Müller // *J. Cell Biochem.* - 2010. - V. 111. - P. 1377–1389.
- 209) **Wiens, M.** Isolation of the silicatein- α interactor silintaphin-2 by a novel solid-phase pull-down assay / M. Wiens, H. C. Schröder, X. H. Wang, T. Link, D. Steindorf, W. E. Müller // *Biochemistry.* - 2011. - V. 50. - P. 1981–1990.
- 210) **Wiens, M.** Molecular control of serial module formation along the apical-basal axis in the sponge *Lubomirskia baicalensis*: silicateins, mannose-binding lectin and mago nashi / M. Wiens, S. I. Belikov, O. V. Kaluzhnaya, A. Krasko, H. C. Schröder, S. Perovic-Ottstadt, W. E. Müller // *Dev. Genes EV.* - 2006. - V. 216. - N. 5. - P. 229-242.
- 211) **Wiens, M.** The role of the silicatein- α interactor silintaphin-1 in biomimetic biomineralization / M. Wiens, M. Bausen, F. Natalio, T. Link, U. Schloßmacher, W. E. G. Müller // *Biomaterials.* - 2009. - V. 30. - P. 1648–1656.
- 212) **Wijnen, P. W. J. G.** Silica gels from aqueous silicate solutions: combined ²⁹Si NMR and small-angle X-ray scattering spectroscopic study / P.W.J.G. Wijnen, T.P.M. Beelen, R.A. Santen // *American Chemical Society.* - 1994. - P.517 — 531.
- 213) **Xu, X.** The X3LYP extended density functional for accurate descriptions of nonbond interactions, spin states, and thermochemical properties / X. Xu, W. A. Goddard // *PNAS.* - 2004. - V. 101. - P. 2673–2677. DOI: 10.1073/pnas.0308730100.
- 214) **Yang, J.** Vulnerability to the impact of temperature variability on mortality in 31 major Chinese cities / J. Yang, M. Zhou, M. Li, X. Liu, P. Yin, Q. Sun, J. Wang, H. Wu, B. Wang, Q. Liud // *Environmental Pollution.* - 2018. - V. 239. - P. 631-637.
- 215) **Ye, M.** Priming of jasmonate-mediated antiherbivore defense responses in rice by silicon / M. Ye, Y. Song, J. Long, R. Wang, S. R. Baerson, Z. Pan, K. Zhu-Salzman, J. Xie, K. Cai, S. Luo, R. Zeng // *PNAS.* - 2013. - V. 110. - I. 38. - P. E3631-E3639.
- 216) **Yeon, J.** Reaxff Molecular Dynamics Simulations of Hydroxylation Kinetics for Amorphous and Nano-Silica Structure, and its Relations with Atomic Strain Energy / J. Yeon, A. C. Duin // *J. Phys. Chem. C.* - 2016. - V. 120. - P. 305-317.
- 217) **Yu, Q.** Silicate bioceramics: from soft tissue regeneration to tumor therapy / Q. Yu,

- J. Chang, C. Wu // *J Mater Chem B*.- 2019.- V. 7.- I. 36.- P. 5449-5460.
- 218) **Yu, Z.** A novel pathway for the synthesis of ordered mesoporous silica from diatomite / Z. Yu, Y. Wang, X. Liu, J. Sun, G. Sha, J. Yang, C. Meng // *Materials Letters*.- 2014.- V. 119.- P. 150-153.
- 219) **Zerda, T. W.** Study of polymerization processes in acid and base catalyzed silica sol-gels / T. W. Zerda, I. Artaki, J. Jonas // *J. Non-Cryst. Solids*. - 1986. - V. 81. - P. 365–379.
- 220) **Zhang, X-Q.** Structure-Directing Role of Counterions in the Initial Stage of Zeolite Synthesis / X-Q. Zhang, T. T. Trinh, R. A. van Santen, A. P. J. Jansen // *J. Phys. Chem. C*. - 2011. - V. 115. - N. 19. - P. 9561-9567.
- 221) **Zhang, X.** Atomistic origin of amorphous-structure-promoted oxidation of silicon / X. Zhang, Y. Duan, X. Dai, T. Li, Y. Xia, P. Zheng, H. Li, Y. Jiang // *Appl. Surf. Sci.*- 2020.- V. 504.- I. 144437.- P. 1–11.
- 222) **Zhao, X.** Effect of organic matter and calcium carbonate on behaviors of cadmium adsorption-desorption on/from purple paddy soils / X. Zhao, T. Jiang, B. Du // *Chemosphere*.- 2014.- V. 99.- P. 41-48.
- 223) **Zhou, Y.** Efficient catalysis of polysiloxane synthesis by silicatein α requires specific hydroxy and imidazole functionalities / Y. Zhou, K. Shimizu, J. N. Cha, G. D. Stucky, D. E. Morse // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 1999. - V. 38. - P. 780-782.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица 1 - Геометрические параметры молекулы ортокремниевой кислоты и молекулы воды, полученная разными методами

Si-O-Si	O-Si-O	Si-O, Å	Si-O-H	O-H, Å	H-O-H (воды)	O-H, Å	Публикация
153 ^б	109,4 ^б	1,61 ^а			104,5 ^д	0,98 ^д	Экспериментальные данные
	108°(1)	1,57	117°(2)	0,99	103°	0,99	FG
	109°(2)		119°(1)				
	110°(2)		121°(1)				
	113°(1)						
	108(3)	1,57	117°(3)	0,99	106°	0,98	FG
	112°(3)		119°(3)				
	107°(2)	1,57	116°(4)	0,99	105°	0,99	FG
	111°(4)						
	108°	1,57	117°(1)	0,99	105°	0,98	FG, рисунок 3d
	112°		119°(2)				
			120°(1)				
156°±(2 6,28)	109°±(1 2-14)	1,59±(0,10- 0,12)			104°±(15 -17)	0,97±(0,0 7-0,08)	силикаты золь-гель
159°±(2 3-25)	109°±(1 2-14)				104°±(15 -16)	0,97±(0,0 7-0,08)	(Rimsza <i>et al.</i> , 2017)

Примечание: Экспериментальные данные: где а- метод нейтронной дифракции, б- метод электронной дифракции, с – метод рассеяния рентгеновских лучей, д – электронная дифракция, е - электрическая резонансная спектроскопия с молекулярным пучком. Используемые публикации (Fueston and Garofalini, 1990) и (Rimsza *et al.*, 2017)

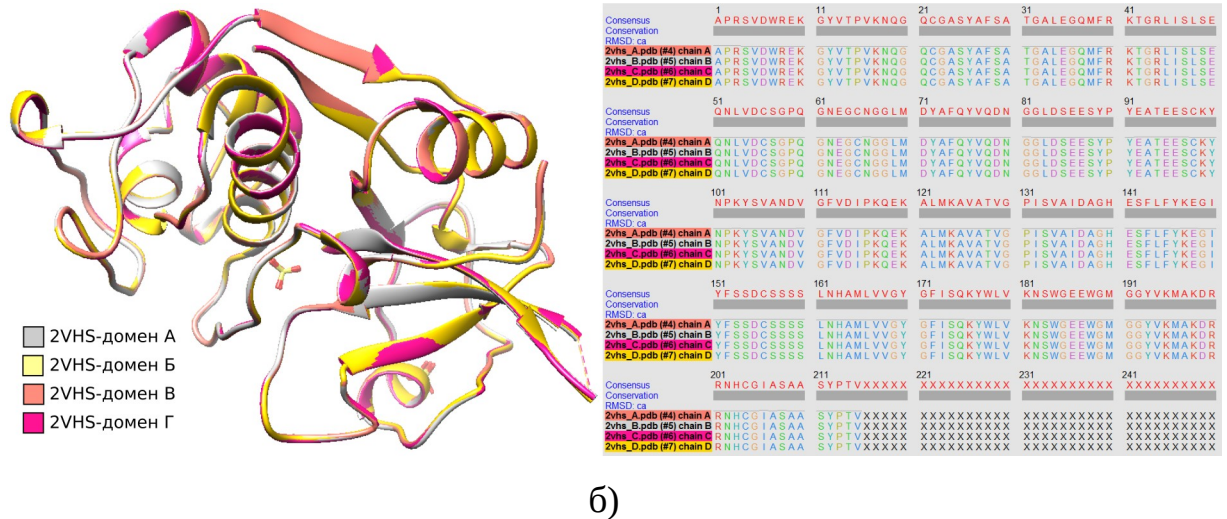


Рисунок 1 — Структурное выравнивание 4-х доменов химерного белка «4SER» катепсина L человека (pdb 2VHS), выполнено в UCSF Chimera, где а)- пространственные структуры, б) – сравнение первичных последовательностей

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица 1 - Водородные связи в оптимизированной каталитической триаде с и без субстрата с положением πN имидазольного кольца His кнаружи (состояние 1, рисунок 3.1)

Вид связи	Длина, Å	Вид связи	Длина, Å
His τN - H ₁₈ Gln (a)	1,84	Ser H ₁₅ - O ₂ Si(OH) ₄ (б)	1,86
Gln O ₉ - H ₈ Si(OH) ₄ (б)	1,89	Ser O ₂ - H ₆ Si(OH) ₄ (б)	1,81
Gln H ₁₈ - O ₃ Si(OH) ₄ (б)	1,74		

Таблица 2 - Водородные связи в оптимизированной каталитической триаде с и без субстрата, с протонированием πN имидазольного кольца His и расположением πN кнаружи (состояние 2, рисунок 3.2)

Вид связи	Длина, Å	Вид связи	Длина, Å
His H ₁₈ - O ₁₈ Ser (a)	1,94	Ser O ₆ - H ₇ Si(OH) ₄ (б)	1,8
His H ₁₈ - O ₂ Si(OH) ₄ (б)	1,96	Gln H ₁₈ - O ₄ Si(OH) ₄ (б)	1,82
Gln H ₁₈ - O ₄ Si(OH) ₄ (б)	1,87		

Таблица 3 - Водородные связи в оптимизированной каталитической триаде с и без субстрата, с протонированием τN имидазольного кольца His и расположением πN кнаружи (состояние 3, рисунок 3.3)

Вид связи	Длина, Å	Вид связи	Длина, Å
His τN-H - O ₉ Gln (a)	1,91	Ser O ₆ - H ₇ Si(OH) ₄ (б)	1,82
His πN - H ₁₃ Ser (б)	1,75	Gln H ₁₈ - O ₄ Si(OH) ₄ (б)	1,84
Gln O ₉ - H ₆ Si(OH) ₄ (б)	1,76		

Таблица 4 - Водородные связи в оптимизированной каталитической триаде с и без субстрата с положением τN имидазольного кольца His кнаружи (состояние 5, рисунок 3.4)

Вид связи	Длина, Å	Вид связи	Длина, Å
His τN - H ₁₈ Gln (a)	1,8	Ser H ₁₂ - O ₄ Si(OH) ₄ (б)	2,13
Gln O ₉ - H ₈ Si(OH) ₄ (б)	1,92	Ser O ₆ - H ₇ Si(OH) ₄ (б)	1,81
Gln H ₁₈ - O ₄ Si(OH) ₄ (б)	1,98	His τN - H ₆ Si(OH) ₄ (б)	1,64

Таблица 5 - Водородные связи в оптимизированной каталитической триаде с и без субстрата, с протонированием πN имидазольного кольца His и расположением τN кнаружи (состояние 6, рисунок 3.5)

Вид связи	Длина, Å	Вид связи	Длина, Å
His τN – H ₁₈ Gln (a)	2,1	Ser O ₆ – H ₇ Si(OH) ₄ (б)	1,83
His τN – H ₉ Si(OH) ₄ (б)	1,81	Gln H ₁₈ – O ₂ Si(OH) ₄ (б)	1,91
Gln O ₉ – H ₈ Si(OH) ₄ (б)	1,71		

Таблица 6 - Водородные связи в оптимизированной каталитической триаде с и без субстрата, с протонированием πN имидазольного кольца His и расположением πN кнаружи (состояние 7, рисунок 3.6)

Вид связи	Длина, Å	Вид связи	Длина, Å
His H ₁₆ – O ₉ Gln (a)	1,91	Ser O ₆ – H ₇ Si(OH) ₄ (б)	1,83
His H ₁₆ – O ₂ Si(OH) ₄ (б)	1,81	Gln H ₁₈ – O ₅ Si(OH) ₄ (б)	1,91
Gln H ₁₈ – O ₄ Si(OH) ₄ (б)	1,87	Gln O ₁₈ – H ₈ Si(OH) ₄ (б)	1,71

Таблица 7 - Водородные связи в оптимизированной каталитической триаде с и без субстрата, с протонированием τN и πN имидазольного кольца His и расположением τN кнаружи (состояние 8, рисунок 3.7)

Вид связи	Длина, Å	Вид связи	Длина, Å
His H ₁₈ – O ₆ Ser (a)	1,83	Ser N ₅ – H ₆ Si(OH) ₄ (б)	1,75
His H ₁₇ – O ₉ Gln (a)	2,25	Ser H ₁₁ – O ₄ Si(OH) ₄ (б)	2,75
Ser H ₁₁ – O ₉ Gln (a)	2,22	His H ₁₆ – O ₃ Si(OH) ₄ (б)	1,65
Gln H ₁₈ – O ₄ Si(OH) ₄ (б)	1,96	His H ₁₇ – O ₂ Si(OH) ₄ (б)	2,25
Gln O ₉ – H ₇ Si(OH) ₄ (б)	1,61		

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблица 1 - Данные изменения трендов колебаний долей олигомеров различной длины в ходе МД для системы45 и системы56

Si _n	Система45			Система56		
	Уравнение	Угол, °	СКО	Уравнение	Угол,°	СКО
1	-0,0009093x + 0,6041	-0,052	0,026	-0,007086x + 0,6658	0,024	-0,406
2	0,001736x + 0,1903	0,099	0,023	0,002113x + 0,2336	0,027	0,121
3	-0,002156x + 0,09594	-0,124	0,021	-0,004688x + 0,1383	0,025	-0,269
4	-0,0002856x + 0,04684	-0,016	0,017	-0,007983x + 0,09251	0,022	-0,457
5	0,0001741x + 0,02492	0,01	0,014	-0,008091x + 0,06507	0,02	-0,464
6	0,0004429x + 0,0148	0,025	0,012	0,001251x + 0,03013	0,017	0,072
7	0,0004652x + 0,008665	0,027	0,011	0,0005906x + 0,02268	0,015	0,034
8	0,0005811x + 0,004669	0,033	0,009	0,001627x + 0,01383	0,093	0,015
9	0,0004213x + 0,002547	0,024	0,007	0,00471x + 0,003602	0,27	0,014
10				0,004637x + 0,0007648	0,266	0,013
11				0,002468x + 0,00193	0,141	0,011
12				0,002819x - 0,0003114	0,162	0,01
13				0,002891x - 0,00124	0,166	0,009
14				0,001848x - 0,0004683	0,106	0,008
15				0,001256 x - 0,0002607	0,072	0,007
16				0,0008529 x - 0,0004202	0,049	0,005

Таблица 2 — Значения энергий лигандов, задействованных в докинге. Энергии получены после оптимизации в программном пакете ORCA, методом DFT с гибридным функционалом B3LYP и базисным набором 6-311G

Структура	Е, эВ	Структура	Е, эВ	Структура	Е, эВ
Q ⁰ ₁	-16129,99	Q ² ₄	-35281,89	Q ² ₃ Q ³ ₂	-42797,36
Q ¹ ₂	-30183,3	Q ¹ ₃ Q ³ ₁	-36587,33	Q ² ₅	-44102,8
Q ² ₃	-26461,11	Q ¹ ₂ Q ² ₂	-36587,17	Q ² ₆	-52923,36
Q ¹ ₂ Q ² ₁	-27766,51	Q ¹ ₁ Q ² ₂ Q ³ ₁	-35281,60	Q ¹ ₂ Q ² ₄	-54228,79
Q ² ₂ Q ³ ₂	-33976,32	Q ¹ ₂ Q ² ₃	-45407,61		

Таблица 3 — Предсказанные модели пре-силикатеина- α (код NCBI: AAC23951.1) и сравнение ее с экспериментальными данными (6ZQ3 и 2VHS, домен A)

модель	метод	QMEAN оценка	модель	метод	QMEAN оценка
6ZQ3	рентгеноструктурный анализ, 2,4 Å разрешение (Görlich et al., 2020)	-1,11	rm5	Robetta	1,42
2VHS, домен A	рентгеноструктурный анализ, 1,5 Å разрешение (Fairched et al., 2009)	-3,31	m1_200_1	QUARK	-8,63
m1	Robetta	0,07	m1_200_2	QUARK	-9,77
fm1	Robetta	0,08	m1_200_3	QUARK	-8,39
fm2	Robetta	-0,02	m1_200_4	QUARK	-6,62
fm3	Robetta	0,12	m1_200_5	QUARK	-11,41
fm4	Robetta	-0,35	m150_330 _1	QUARK	-5,60
fm5	Robetta	0,23	m150_330 _2	QUARK	-5,59
rm1	Robetta	1,66	m150_330 _3	QUARK	-6,05
rm2	Robetta	1,36	m150_330 _4	QUARK	-4,71
rm3	Robetta	1,44	m150_330 _5	QUARK	-6,32
rm4	Robetta	1,61			

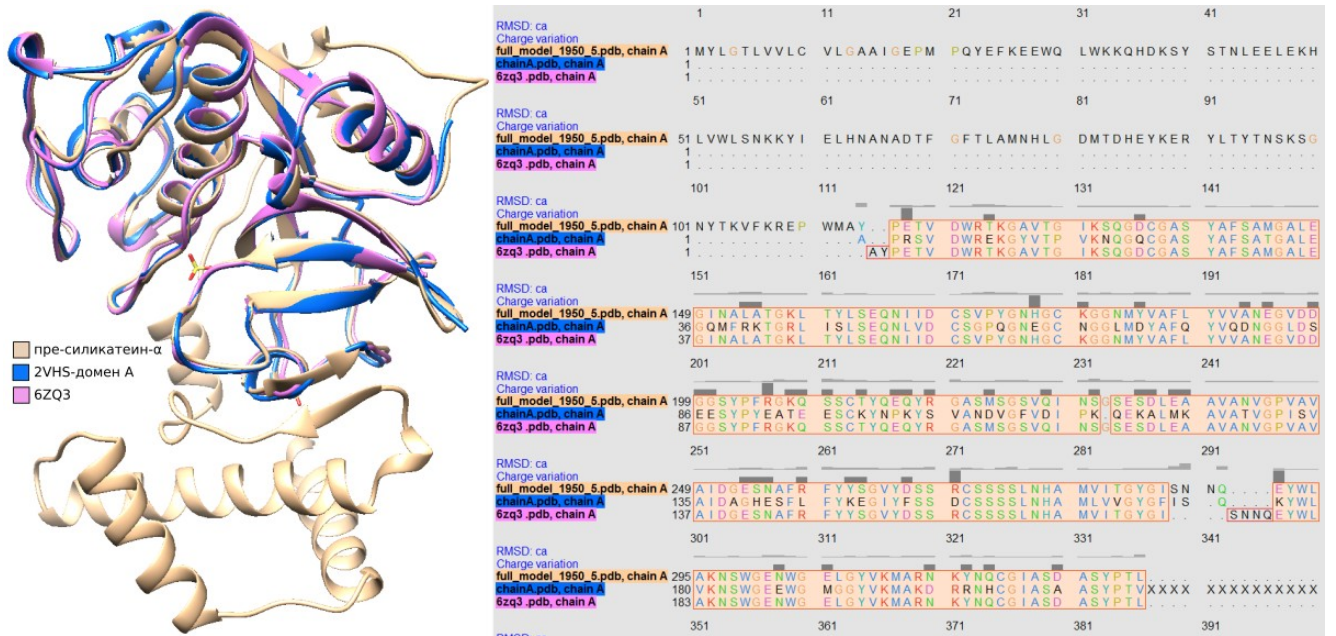


Рисунок 1 — Структурное выравнивание предсказанной модели пре-силикатеина-α (код NCBI: AAC23951.1), pdb 6ZQ3 (Görlich *et al.*, 2020) и pdb 2VHS-A (Fairched *et al.*, 2009)

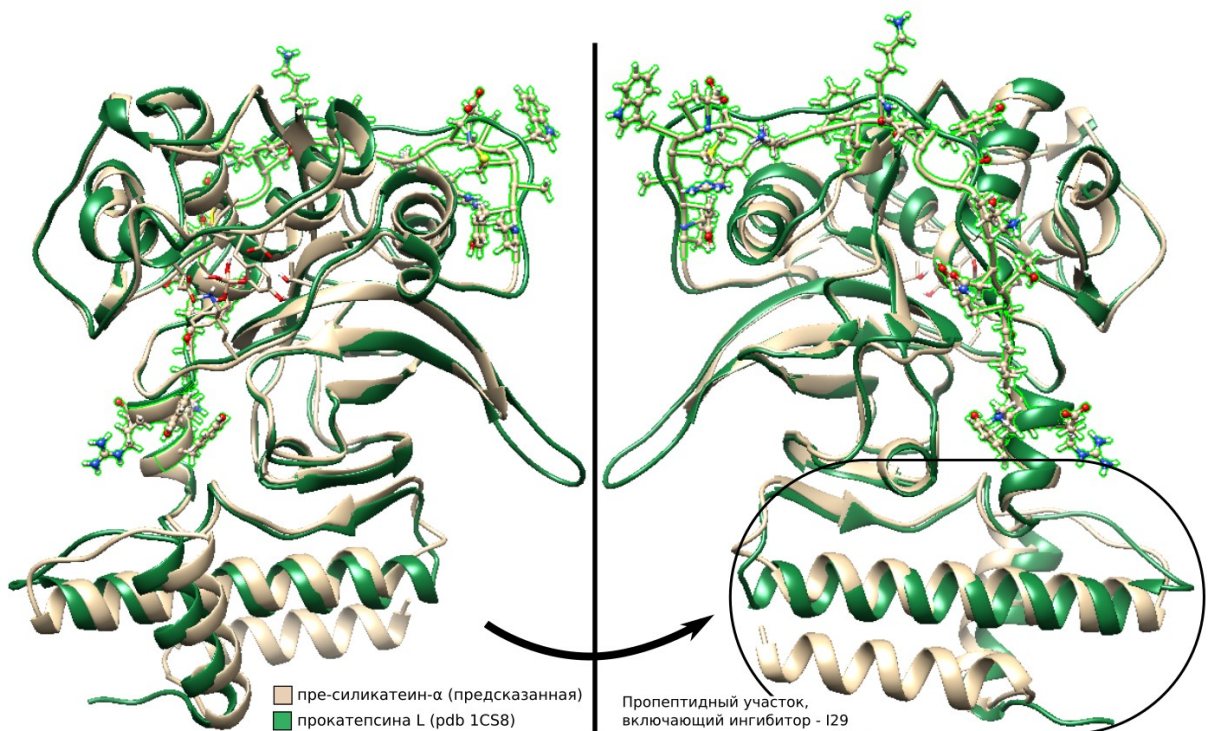
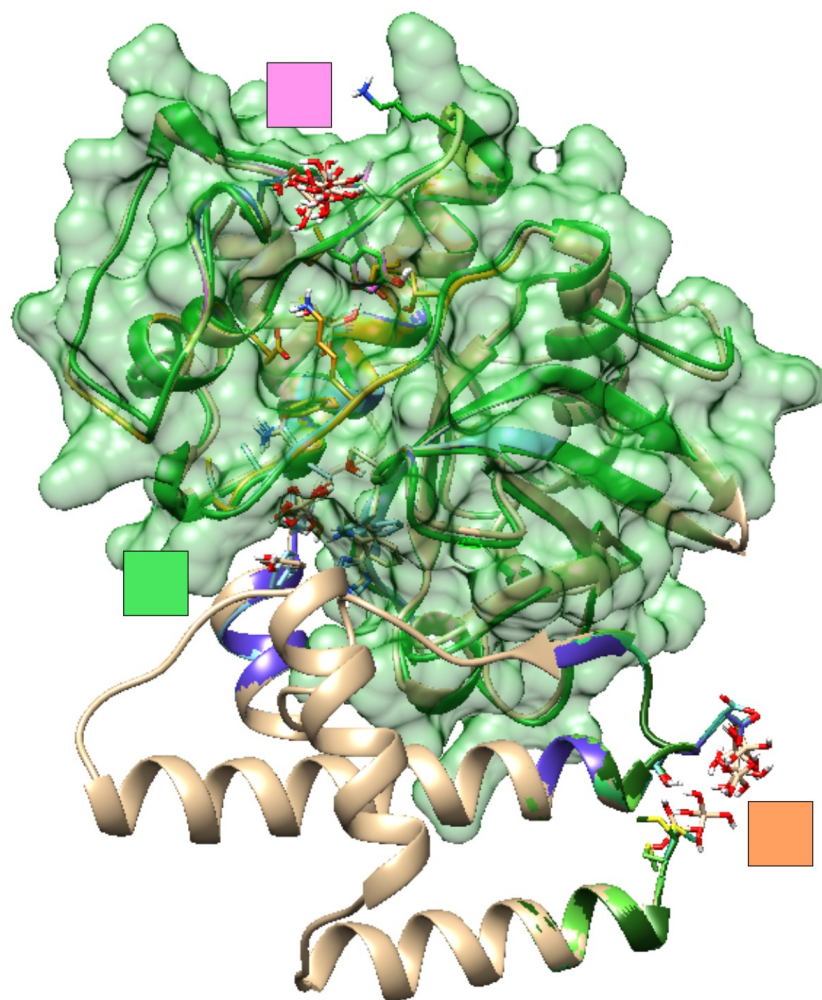


Рисунок 2 — Структурное выравнивание предсказанной модели пре-силикатеина-α (код NCBI: AAC23951.1) и прокатепсина L (pdb 1CS8)



пре-силикатеин- α :	Asp68	Ser131	Thr329
силикатеин- α :	Asp6	Ser25	Thr94

Рисунок 3 — Области связывания лиганда (молекула ортокремниевой кислоты) с поверхностями пре-силикатеином- α (бежевый) и силикатеином- α (синий).

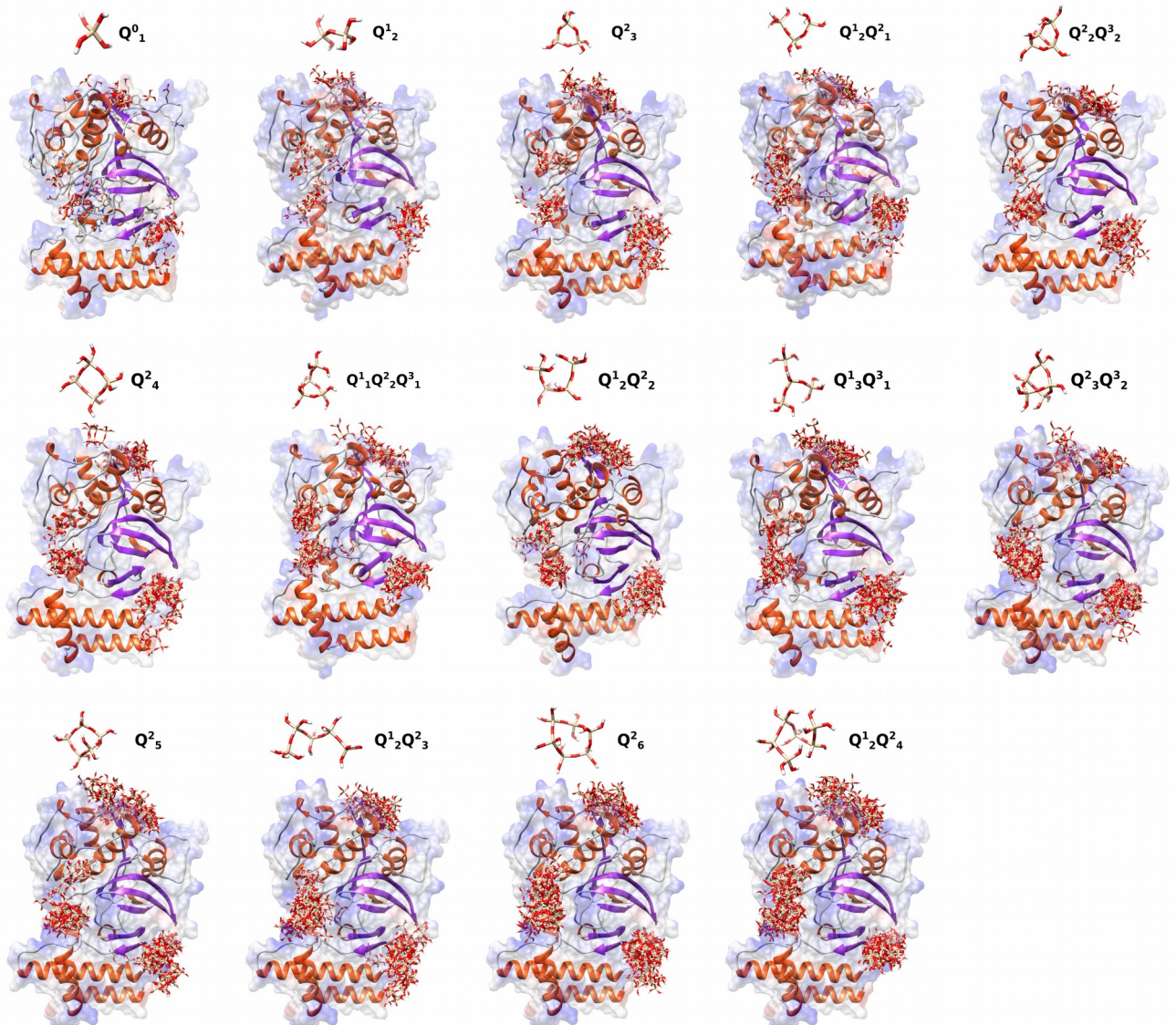


Рисунок 4 — Области связывания лигандов с поверхностью пре-силикатеином- α

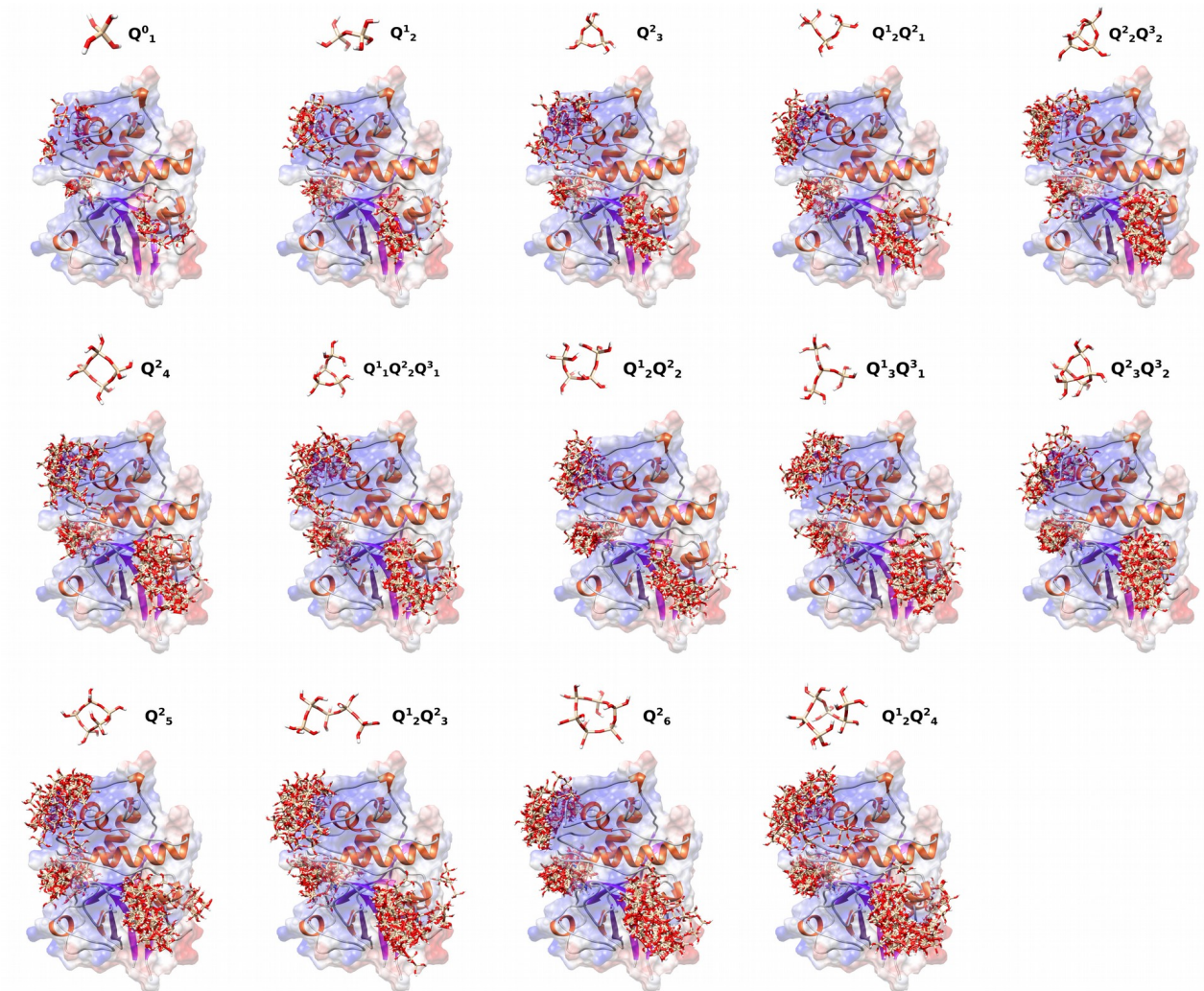


Рисунок 5 — Области связывания лигандов с поверхностью силикатеином- α

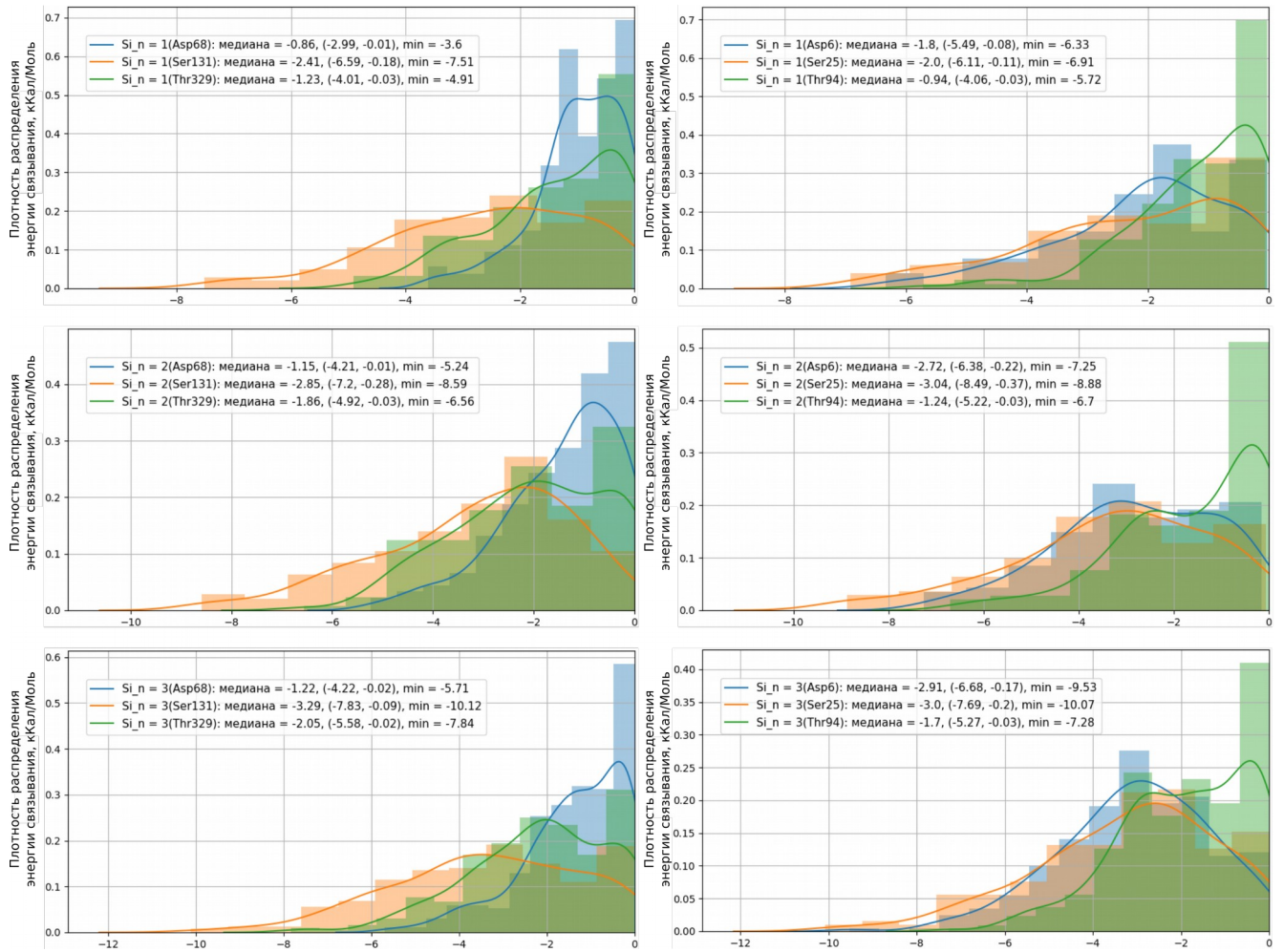


Рисунок 6 — Распределение энергий связывания для лигандов крениевых кислот с длиной цепочки $Si_n=1 - 3$. Левая колонка — пре-силикатеин- α , правая — силикатеина- α

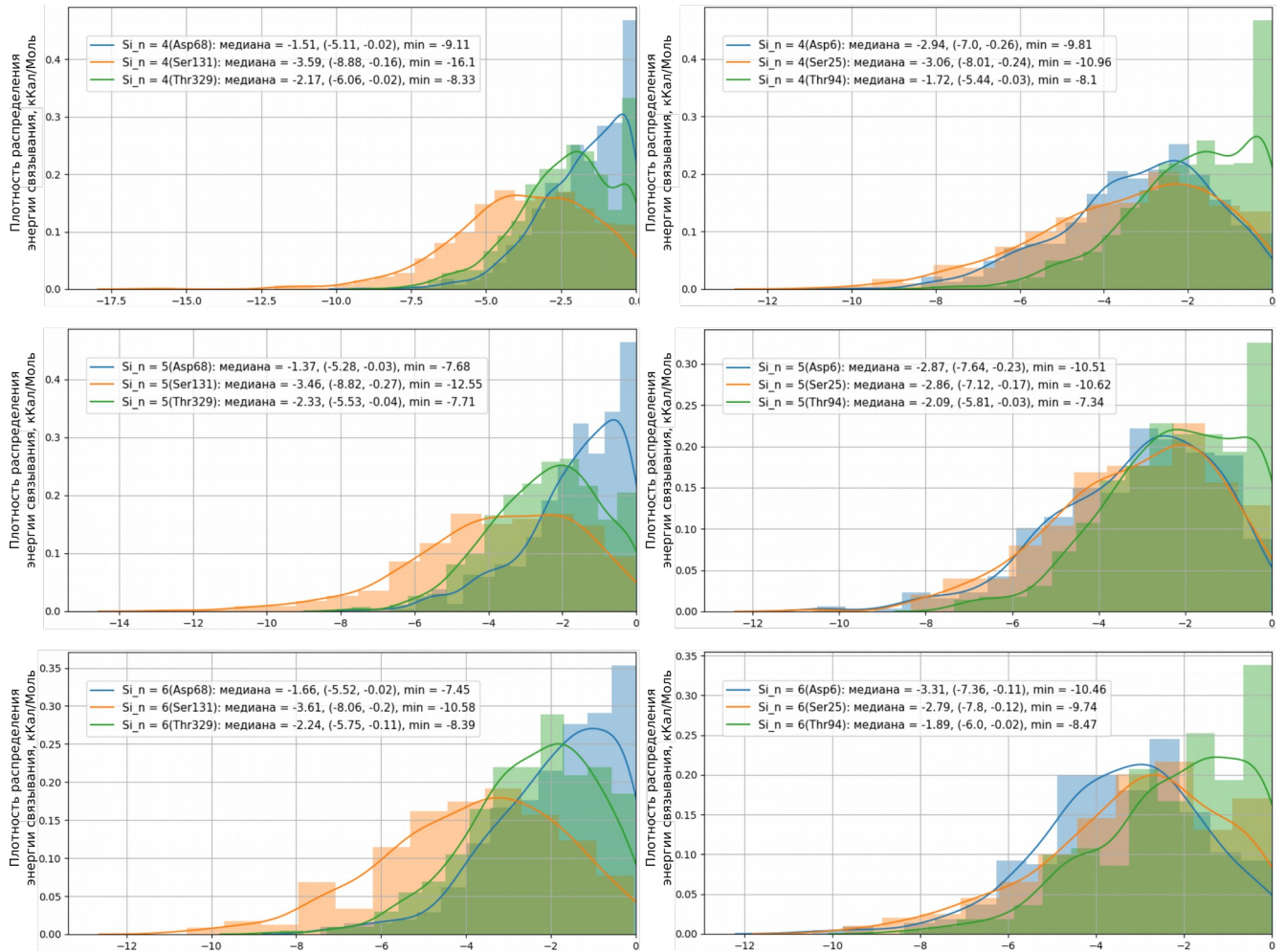


Рисунок 7 — Распределение энергий связывания для лигандов крениевых кислот с длиной цепочки $Si_n=4 - 6$. Левая колонка — пре-силикатеин- α , правая — силикатеина- α

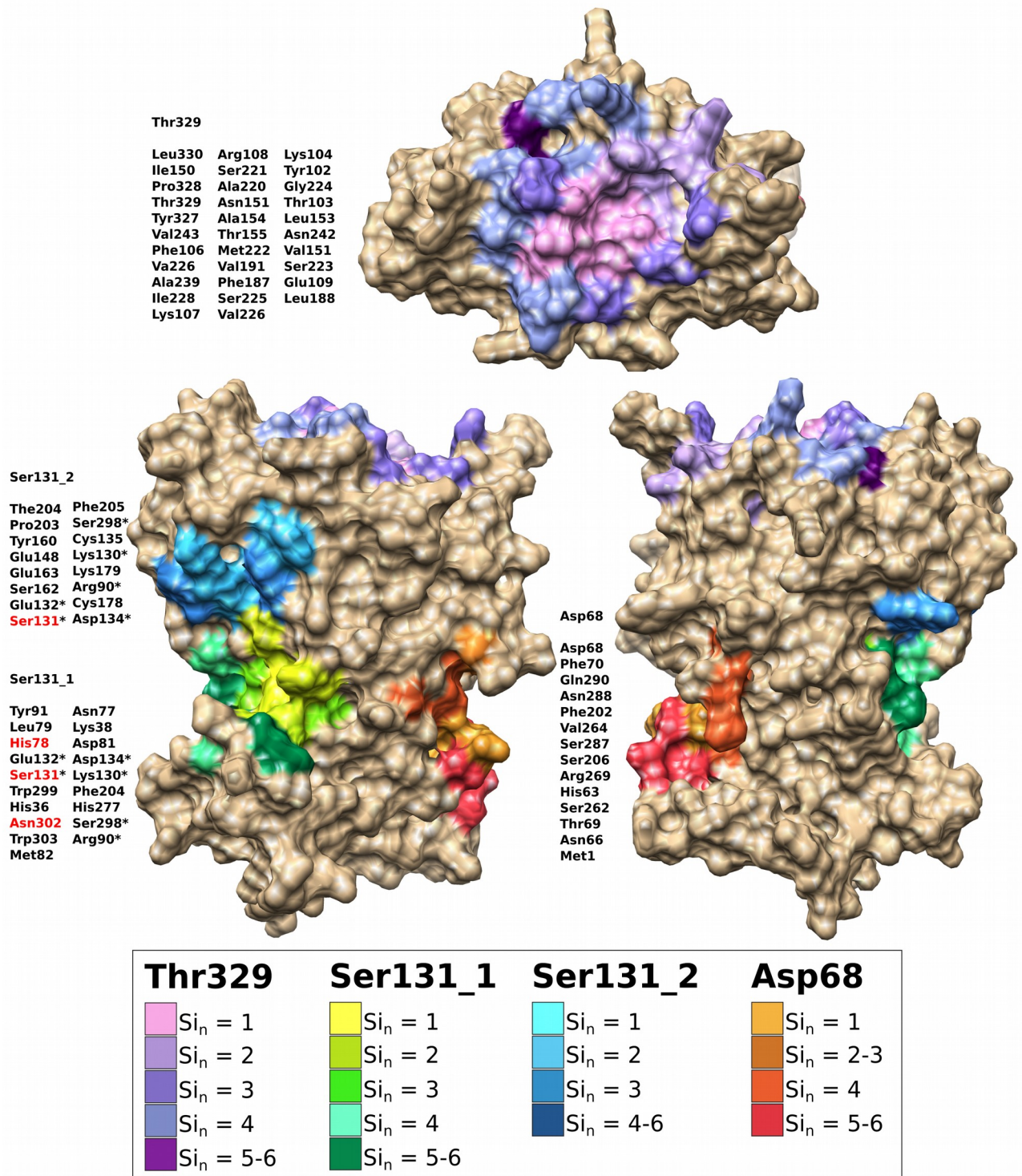


Рисунок 8 — Поверхность пре-силикатеин-α, цветами раскрашены области связывания с лигандами с длиной цепочки $Si_n=1-6$

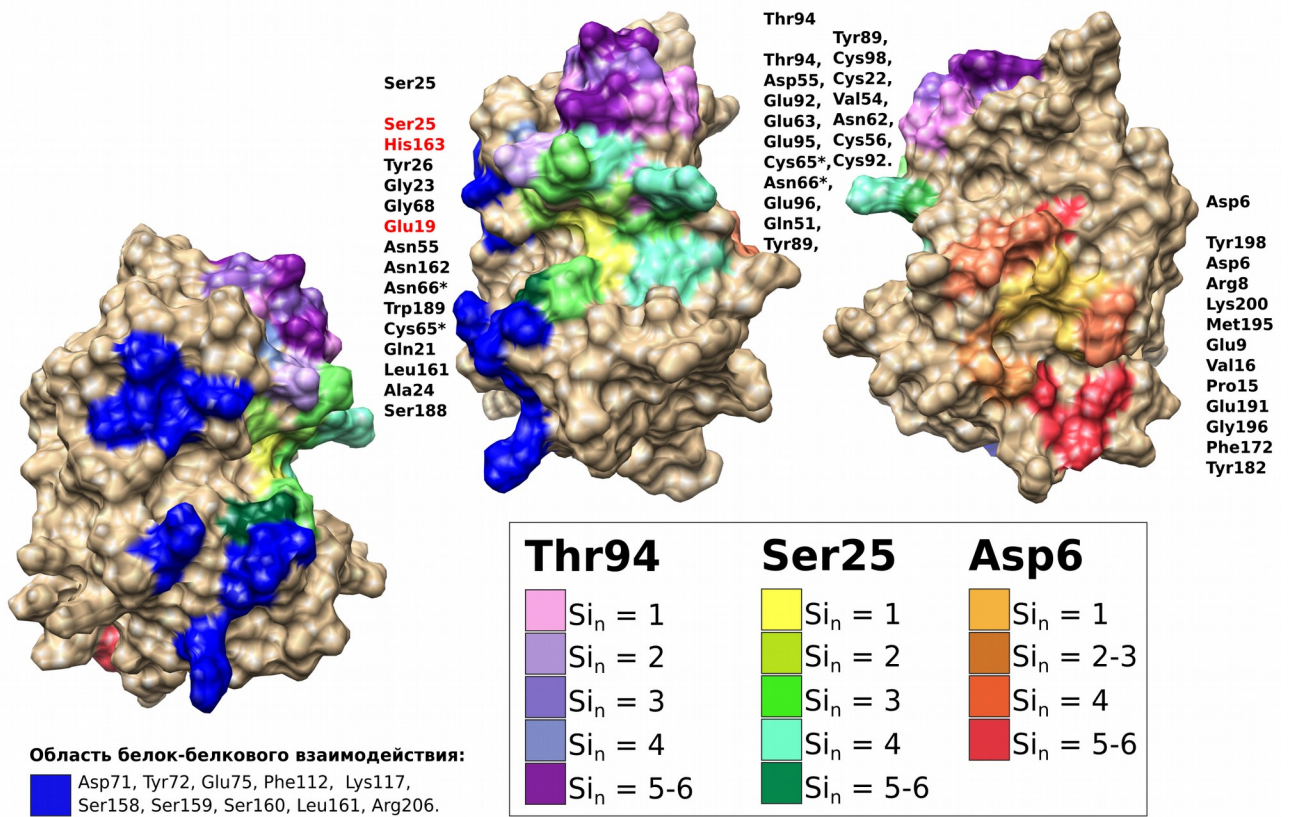


Рисунок 9 — Поверхность силикатеин- α , цветами раскрашены области связывания с лигандами с длиной цепочки $Si_n=1-6$

Таблица 4 — Параметры связывания белково-белкового комплекса, рецептором и лигандом вытупает — силикатеин- α . Молекулярный докинг проводился в сервисе ROSIE (Lee and Zhang, 2012)

Модель силикатеин- α _A-*	Энергия, ккал/Моль	Водородные связи между белками (силикатеин- α _A-*), Å
-A1 (6 связей)	-429,58	-A1 Ser159 OG — -A Phe112 H 0,844 -A Gly68 O — -A1 Tyr72 NH 2,367 -A Ser160 OG — -A1 Gln75 2HE2 2,046 -A Leu161 O — -A1 Gln75 1HE2 1,922 -A Phe112 O — -A1 Ser159 HG 1,901 -A Gln75 OE1 — -A1 Ser160 HG 1,455
-A2 (4 связи)	-429,576	-A2 Ser159 OG — -A Phe112 H 2,282 -A Ser159 OG — -A2 Phe112 H 1,818 -A Phe112 O — -A2 Ser159 HG 1,680 -A Gln75 OE1 — -A2 Ser160 HG 1,945
-A3 (5 связей)	-429,447	-A3 Lys117 O — -A Tyr72 NH 2,209

		-A3 Glu63 OE2 — -A Ser158 H 2,594 -A Lys117 O — -A3 Tyr72 HH 1,718 -A Asp71 OD2 — -A3 Lys117 3HZ 2,396 -A Leu161 O — -A3 Ser160 HG 1,998
-A4 (2 связи)	-429,173	-A Asp71 OD2 — -A4 Lys117 H 2,449 -A Leu161 O — -A4 Ser159 HG 1,681
-A5 (5 связей)	-429,264	-A5 Glu63 OE2 — -A Ser158 H 1,673 -A5 Gly61 O — -A Ser158 HG 2,286 -A Lys117 O — -A5 Tyr72 HH 2,155 -A Asp71 OD2 — -A5 Lys117 3HZ 2,106 -A Gly68 O — -A5 Ser159 HG 1,681
-A6 (6 связей)	-428,91	-A6 Lys117 O — -A Tyr72 HH 2,598 -A6 Glu63 OE2 — -A Ser158 H 1,919 -A6 Gly61 O — -A Ser158 HG 2,328 -A Lys117 O — -A6 Tyr72 HH 2,390 -A Asp71 OD2 — -A6 Lys117 3HZ 2,051 -A Gly68 O — -A6 Ser159 HG 1,750
-A7 (2 связи)	-429,146	-A7 Asp71 OD2 — -A Lys117 H 2,518 -A7 Ser160 OG — -A Ser160 HG 2,085
-A8 (3 связи)	-429,063	-A Gly68 O — -A8 Ser 159 HG 2,646 -A Leu161 O — -A8 Ser160 HG 1,958 -A Pro59 O — -A8 Arg206 2HH2 2,327
-A9 (6 связей)	-428,392	-A9 Lys117 O — -A Tyr72 HH 2,145 -A Lys117 O — -A9 Tyr72 HH 1,664 -A Asp71 OD2 — -A9 Lys117 3HZ 2,489 -A Leu161 O — -A9 Ser160 HG 2,565 -A Gly58 O — -A9 Arg206 2HH2 1,893 -A Asn62 O — -A9 Arg206 1HH2 2,787