

МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕКОТОРЫХ БИОПОЛИМЕРОВ КЛЕТКИ *Escherichia coli* С 4-ГЕКСИЛРЕЗОРЦИНОМ

© 2023 г. Э. В. Терешкин^{1*}, К. Б. Терешкина¹, Н. Г. Лойко^{1, 2}, А. А. Генералова¹,
В. В. Коваленко¹, Ю. Ф. Крупнянский¹

¹Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук,
Москва, Россия

²Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук,
Москва, Россия

*E-mail: ramm@mail.ru

Поступила в редакцию 18.10.2022;

после доработки 13.11.2022;

принята в печать 21.11.2022

Методом молекулярного моделирования проводится исследование взаимодействия ауторегуляторного фактора бактерий, химического аналога индукторов анабиоза 4-гексилрезорцина (4ГР), с наружной и внутренней мембранами, белком порином, пептидогликаном, ДНК и стабилизирующим ДНК белком Dps бактерии *Escherichia coli*. Методами молекулярной динамики в полноатомном приближении исследованы концентрационная зависимость и молекулярные механизмы взаимодействия 4ГР с полимерами клетки. Получены пространственные и энергетические характеристики комплексов 4ГР с различными клеточными компонентами. С помощью анализа главных компонент определены характеристики ДНК и белка Dps, связывающего ДНК, в условиях различного содержания 4ГР. Полученные результаты, согласующиеся с экспериментальными данными, позволяют глубже понять процессы, происходящие при защите бактериальной клетки на уровне оболочки и сохранения ДНК нуклеоидными белками.

Ключевые слова: молекулярная динамика, 4-гексилрезорцин, линейная энергия взаимодействия, комплексы Dps–ДНК, моделирование бислойных мембран, бактерия *Escherichia coli*.

DOI: 10.31857/S0207401X23050138, **EDN:** PCHZRI

1. ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию быстроменяющихся и часто крайне неблагоприятных условий окружающей среды. Стрессовыми факторами могут выступать как изменения pH, осмотического давления, температуры, так и воздействие антибиотиков или доступность питательных веществ, связанные, например, с защитными механизмами инфицированного организма, столкновениями с экстремальными средами обитания или сезонными погодными изменениями. Воздействие меняющихся условий окружающей среды определяет особенности жизненного цикла микроорганизмов, а именно необходимость постоянного “переключения” между ростом, выживанием и гибелью. У бактерий для выживания в неблагоприятных условиях существует целый ряд “стратегий выживания” [1, 2], направленных на увеличение выживаемости клеток при том или ином виде стрессового воздействия и обеспечивающих, в первую очередь, сохранность генетической информации [3, 4].

Решающее значение для выживания бактерий играет клеточная оболочка. Оболочка грамотрицательных бактерий состоит из жидкой цитоплазматической мембраны, тонкого слоя клеточной стенки и жесткой наружной мембраны [5]. Слой между внутренней и внешней мембранами (периплазма) содержит, помимо пептидогликановой клеточной стенки, различные белковые структуры. Внешний слой жесткой внешней мембраны состоит из липополисахаридов, несущих отрицательный заряд и являющихся эндотоксичными для заражаемых организмов [6]. Она сохраняет форму клетки [7], обеспечивает структурную жесткость и защиту от осмотического давления, а также образует барьер между бактерией и окружающей средой [8–10].

Генетический материал бактерий — геном, целостности которого постоянно угрожают различные эндогенные и экзогенные стрессовые воздействия, компактно свернут и организован функционально в виде нуклеоида. Последний не ограничен мембраной в отличие от его эукариотического эквивалента — ядра. По аналогии с эу-

кариотическим хроматином бактериальный хроматин также организован на разных масштабах длины с помощью различных механизмов биологической или физико-химической природы. Экзогенные воздействия, повреждающие ДНК, могут иметь как химическую, так и физическую природу [2]. К ним относятся температурные условия, pH среды, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение [11], антибиотики [12] и неантибиотические [13] препараты, различные окислители и др. Эндогенные воздействия имеют место при образовании различных повреждающих веществ или возникновении нарушений в ходе процессов клеточного метаболизма внутри самой клетки. Например, при образовании активных форм кислорода или возникновении конфликтов в системе репликации и транскрипции [14], спонтанных разрывов ДНК при репликации, дефектов после рекомбинации или сегрегации хромосом [15]. Таким образом, защита генома должна предусматривать механизмы, поддерживающие его целостность на протяжении физиологически различных фаз жизненного цикла.

Одним из наиболее распространенных в природе воздействий является стресс голодания, вызываемый недостатком жизненно важных питательных веществ. В процессе длительного голодания бактериальных клеток происходит их дифференцировка с образованием устойчивых к влиянию физических и химических факторов покоящихся форм [16, 17]. Переход бактериальной клетки в покоящееся состояние сопровождается значительным снижением ее чувствительности к антибиотикам, антисептикам, дезинфектантам и консервантам, что создает существенные проблемы в области антибактериальных мероприятий для медицины и производств, где требуется соблюдение условий стерильности [18].

Динамическая организация нуклеоида является следствием как внутриклеточных факторов (т.е. одновременно происходящих клеточных процессов), так и внеклеточных (например, условий окружающей среды, стрессоров). Защита генетического материала бактерий при любом стрессовом воздействии на протяжении всего жизненного цикла колонии обеспечивается с помощью белков, связывающих ДНК (nucleoid-associated protein (NAP)) [19–21]. Эти белки связывают разные участки ДНК с разной специфичностью. При этом некоторые из них схожи с нуклеоидными белками эукариот (гистонами) по своему положению относительно нити ДНК во время связывания и выполняемым функциям (организация/уплотнение хромосомной ДНК). Однако аминокислотные последовательности и структура бактериальных нуклеоидных белков и эукариотических гистонов сильно различаются. Бактериальная хромосома претерпевает глубокие топологические изменения при стрессе, меняя форму и состав в зависи-

мости от фазы роста популяции и состояния клеток, а при длительном голодании может образовывать различные конденсированные структуры [22–25].

С точки зрения защиты целостности ДНК и структуры бактериальной хромосомы наиболее важную роль играет белок Dps (DNA-binding protein from starved cells, связывающий ДНК белок голодающих клеток), выделенный в 1992 году из клеток бактерий *Escherichia coli* (*E. coli*), испытывавших стресс голодания [26]. Наибольшее количество белка Dps наблюдается в стационарной фазе роста бактериальной колонии (85–180 тыс. молекул на клетку), в то время как в логарифмической фазе его содержание значительно ниже (6–8.5 тыс. молекул на клетку) [27]. Гомологи Dps обнаруживаются у большинства бактерий и архей. Белки Dps принадлежат к семейству ферритиновых белков. Они играют важную роль в стабилизации ДНК, защите клетки от активных форм кислорода, а также накоплении и хранении ионов железа (окисление ионов Fe^{2+} с накоплением образовавшегося Fe_2O_3 внутри полости белка). Целый ряд исследований посвящен участию Dps в ответе бактерий на различные виды стресса. Снижение выживаемости мутантов, не синтезирующих белок Dps, в условиях стресса показало, что Dps обеспечивает защиту от окислительного, теплового, кислотного стрессов, а также стрессов голодания, воздействия ультрафиолетового и γ -излучения, токсичных ионов металлов [28–31]. Наиболее выраженный эффект, сопряженный с опосредованными белком Dps перестройками в бактериальной ДНК, вызывается стрессом голодания и окислительным стрессом.

В исследованиях *in vitro* были получены данные по трехмерной структуре отдельных молекул белка Dps и его кристаллов, а также по возможным механизмам их взаимодействия с ДНК [32–37]. Методами *in silico* исследованы температурные флуктуации белка Dps [38] и механизмы связывания Dps с ДНК в условиях различного ионного состава [39], в трехмерных кластерах и кристаллах [40], в присутствии малых молекул [41, 42]. В первую очередь Dps определяется как цитоплазматический белок, однако необходимо отметить и ряд работ, подтверждающих присутствие Dps [43–45] и его гомологов [46] в белковом компартменте внешней мембраны бактериальных клеток, что оказывает выраженное влияние на чувствительность клеток к антибиотикам и резистентность к бактериофагам. Кроме того, гомологи Dps были обнаружены в составе экзопротеома архей [47], а также обнаружено участие Dps в процессах образования биопленок [48].

Помимо белков Dps, к важным метаболитам бактериальной клетки, которые также вырабатываются в цитоплазме к стационарной фазе роста,

относятся аутоиндукторы анабиоза. По химической природе они представляют собой фенольные липиды, производные алкилрезорцинов (АР), и регулируют переход бактерий в покоящееся состояние [1, 49, 50]. Наиболее интересным для исследования и применения является химический аналог индукторов анабиоза — 4-гексилрезорцин (4ГР, по номенклатуре ИЮПАК — 1,3-диокси-4-н-гексилбензол). Его воздействие на бактериальные клетки было изучено *in vivo* и *in vitro* [42, 51]. Обнаружено, что алкилрезорцины легко проникают через оболочку клеток [17, 52]. Внутри клетки 4ГР способен образовывать комплексы с мембранными липидами и клеточными биополимерами [42, 53–55]. Эффект, производимый на клетку бактерии при экзогенном добавлении этого вещества, зависит от стадии роста бактериальной колонии и концентрации ауторегулятора [17, 41]. Низкие концентрации (10^{-6} – 10^{-4} М) повышают стрессоустойчивость клеток. Повышение концентрации приводит к образованию анабиотических форм. Сверхпороговые концентрации (свыше $5 \cdot 10^{-4}$ М) вызывают образование неживых, “мумифицированных” форм [17].

В экспериментах *in vitro* обнаруживают дозозависимые эффекты при воздействии на белки: повышение функциональной активности при взаимодействии с 4ГР в малых дозах и ингибирование при повышении дозы 4ГР [56–58]. Был обнаружен мутагенный эффект 4ГР при его воздействии на ДНК бактериальных клеток [59]. Последняя при длительном хранении [60] и в условиях УФ-облучения [61] стабилизируется в присутствии 4ГР. Стабилизация происходит пропорционально концентрации регулятора.

Основываясь на вышесказанном, можно предположить, что аутоиндукторы анабиоза, образующиеся в клетке во время стационарной фазы, могут взаимодействовать с различными биомолекулами в бактериальных клетках. Начиная от ДНК и белков, связывающих ДНК, и заканчивая оболочками клеток — мембранами, пептидогликаном и мембранными белками. Такое взаимодействие, как показано в предыдущих работах *in vivo*, отражается на жизнеспособности клеток и их устойчивости к воздействию окислителей, вредных метаболитов и различных неблагоприятных физико-химических факторов (повышенной температуры, излучений и др.). Цель данной работы — комплексное исследование механизмов взаимодействия 4ГР с различными биополимерами *E. coli* методами молекулярной динамики (МД).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Компьютерные модели

В работе строились и изучались полноатомные модели систем. Было исследовано взаимодей-

ствие 4ГР с моделями внешней и внутренней мембран бактерии *E. coli*, мембранным белком порином, цитоплазматическим связывающим ДНК белком Dps, комплексами ДНК–Dps и ДНК в растворе.

Модели мембран были построены в двух вариантах: как содержащие белок порин, так и не содержащие его. Все мембраны были периодическими, во избежание краевых эффектов из-за экспонированных наружу гидрофобных липидных хвостов.

Внутренняя (клеточная) мембрана содержала молекулы липидов в соотношении 3 : 1 (63 и 21 молекулу): 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (ПОФЭ) и 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицерин-3-фосфоглицерина (ПОФГ), соответственно, в каждом из слоев. Для нейтрализации избыточного отрицательного заряда в систему было добавлено 42 иона Na^+ . Также в состав систем входило по 20 ионов Na^+ и Cl^- и 8170 молекул воды модели SPC/E. В этой и других системах одна молекула 4ГР замещала десять молекул воды. Изучалось влияние 110, 250, 450, 1000 и 2250 молекул 4ГР на динамику мембран, что соответствовало различным по производимым на клетку эффектам концентрациям 4ГР [17, 41].

Наружная (внешняя) мембрана была асимметричной. Процентное соотношение липидов в ее внутреннем слое был таким же, как и у внутренней мембраны. Он был построен из 285 молекул ПОФЭ и 95 молекул ПОФГ. Внешний слой наружной мембраны состоял из 119 молекул одинаковых по составу липополисахаридов (ЛПС) бактерии *E. coli*. Липополисахарид включал в себя липид А, центральный олигосахарид и пять повторяющихся О-антигенов типа O1B [62]. Каждая из двух фосфатных групп липида А имела заряд q^{2-} . Все углеводородные остатки были насыщены. В систему добавлялось 404 иона Na^+ , 64 иона Ca^{2+} , 368 ионов Mg^{2+} , 193 иона Cl^- и 82000 молекул воды. Количественные соотношения ионов подбирались максимально соответствующими физиологическим в клетке *E. coli* [63]. Состав липидов и их соотношение во внутренней и внешней мембранах были подобраны таким образом, чтобы служить простейшими моделями ровных участков (не изгибов, где еще обязательно содержится кардиолипид) бактериальных мембран, что хорошо согласуется с имеющимися экспериментальными данными [64].

Интегральный белок порин OmpF (структура PDB ID: 1OPF) [65] встраивался в модели мембран в процессе сборки для моделирования каналов. В модели наружной мембраны этот белок был встроен в виде тримера, в модели внутренней — в виде мономера для уменьшения размера систем и ускорения расчетов свободной энергии миграции малых молекул через канал этого белка. При

встраивании тримера белка в модель наружной мембраны, количество липидов становилось равным 236 молекулам ПОФЭ, 79 молекулам ПОФГ, 96 молекулам ЛПС. В систему добавлялось 369 иона Na^+ , 79 ионов Ca^{2+} , 456 ионов Mg^{2+} , 154 иона Cl^- и 92000 молекул воды.

Пептидогликан (муреин) строился в виде монослоя. Это соответствует данным о том, что клеточная стенка *E. coli* содержит 75–80% гликановых нитей в виде монослоя толщиной 4 нм и только 20–25% — в виде трислойа [66, 67]. Моделировалось две нити углеводного остова пептидогликана, содержащего по 10 остатков β -1,4-N-ацетилглюкозамина (N-АГ) и β -1,4-N-ацетилмурамовой кислоты (N-АМ). Остатки N-АГ и N-АМ были связаны гликозидными β -1,4-связями. Такой состав и структура остова пептидогликана характерны для всех бактерий. Остатки N-АМ были также связаны с пентапептидами. В состав каждого пентапептида входили следующие аминокислотные остатки, образующие цепочку: L-аланин (ковалентно связан с N-АМ), γ -D-глутаминовая кислота, мезо-диаминопимелиновая кислота и два остатка D-аланина. Нити остова соединялись между собой в двух местах несимметрично пептидными шивками: пентапептид одной нити с пентапептидом другой. При соединении между собой двух пентапептидов удалялся конечный остаток D-аланина в одном из пептидов; ставший концевым (четвертым по счету) D-аланин соединялся пептидной связью с остатком мезо-диаминопимелиновой кислоты второго пентапептида. Система была сольватирована 38519 молекулами воды, был добавлен 151 ион Na^+ , 29 ионов K^+ , 1 ион Ca^{2+} и 162 иона Cl^- .

Двуцепочечная ДНК моделировалась в В-форме. Последовательность содержала 25 пар нуклеотидов: 5'-GTACATATGATGGGGTGATGGATA-3'. Система ДНК в растворе содержала 191 ион Na^+ (48 из которых — противоионы для нейтрализации избыточного отрицательного заряда олигонуклеотида), 145 ионов Cl^- (150 мМ), до 480 молекул 4ГР и до 55000 молекул воды.

Связывающий ДНК белок Dps моделировался на основе структуры PDB ID:6QVX [35]. Отсутствующие N-концевые аминокислотные остатки добавляли вручную к каждой из субъединиц гомододекамера отдельно, чтобы воспроизвести неупорядоченную укладку этих частей молекулы белка. В комплексах Dps–ДНК молекула ДНК располагалась у поверхности Dps таким образом, чтобы наблюдать формирование комплексов Dps с ДНК за время расчета и исследовать воздействие 4ГР на этот процесс. Белок Dps несет отрицательный заряд, для нейтрализации которого в систему добавляли 48 ионов Na^+ . Также были добавлены 20 ионов Ca^{2+} , 384 иона Na^+ , 424 иона Cl^- и 143457 молекул воды. Исследовали процесс

формирования димеров Dps–ДНК в растворе без 4ГР и в присутствии 50, 100 и 500 молекул 4ГР.

2.2. Параметры расчетов и анализ результатов

Расчеты систем проводились методом классической МД в программном комплексе Gromacs 2018 [68] с использованием полноатомного силового поля AMBER99-PARMBS1. Силовое поле было дополнено рассчитанными *ab initio* в пакете квантовохимических программ FIREFLY [69] параметрами 4ГР, остатков сахаров и особых пептидогликановых аминокислотных остатков. Расчеты проводились методом Хартри–Фока. Для аппроксимации электростатического потенциала с целью нахождения парциальных атомных зарядов был взят расширенный базисный набор 6-311++G(d,p). Электростатический потенциал строился с помощью алгоритма GEODESIC. Для сольватации систем использовалась модель воды SPC/E.

Потенциальная энергия построенных систем минимизировалась методом наискорейшего спуска. Затем проводилась последовательная релаксация систем при постоянных объеме и давлении. Времена релаксации варьировались в зависимости от системы и составляли, как правило, 100 пс для Dps и ДНК, 250 пс для мембран и 1 нс для пептидогликана.

Постоянная температура (300–313 К) поддерживалась стохастическим (ланжевеновским) термостатом с постоянной времени 2 пс. Расчеты проводили при постоянном давлении, которое поддерживалось термостатом Парринелло–Рамана с постоянной времени, составляющей 2 пс. Для систем ДНК, Dps и пептидогликана давление в 1 атм поддерживалось изотропным способом. При расчетах модельных мембран давление поддерживалось полуизотропным способом. Параметры взаимодействий связанных атомов и ближних взаимодействий рассчитывали для каждого временного шага. Электростатические взаимодействия на больших расстояниях рассчитывали методом суммирования по Эвальду (Particle Mesh Ewald (PME)). Радиусы обрезания для всех типов взаимодействия брались равными 1.5 нм. Список соседей поддерживался с помощью схемы отсечки Верле и обновлялся каждые 10 фс. Быстрые степени свободы ограничивались с помощью алгоритма LINCS. Шаг интегрирования составлял 2 фс (для пептидогликана — 1 фс), длина траекторий — 0.1 мкс. Анализ результатов и визуализацию проводили с помощью оригинальных модулей, а также средствами программ Gromacs 2018 [68] и VMD [70].

Перед нахождением динамических характеристик ДНК и белков проводили анализ главных компонент [71]. Из общей траектории с помощью вспомогательной программы *trjconv* выделялись

траектории движения молекул или их участков. Искомые части молекул центрировались в ячейке во избежание смещения в соседнюю периодическую ячейку. Для уменьшения числа степеней свободы рассматривались α -С-атомы белка и атомы фосфора ДНК. Строилась ковариационная матрица размером $3N \times 3N$, в которой каждый из элементов находился на основании одной из координат (x , y или z) каждого из N рассматриваемых атомов:

$$C_{ij} = \langle M_{ii}^{1/2} (x_i - \langle x_i \rangle) M_{jj}^{1/2} (x_j - \langle x_j \rangle) \rangle. \quad (1)$$

Здесь M_{ii} — единичная матрица: i, j — одна из атомных координат.

Матрица (1) диагонализировалась с помощью матрицы ортонормированного преобразования R с выделением собственных векторов и собственных значений:

$$R^T C R = \text{diag} \{ \lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_{3N} \}. \quad (2)$$

Здесь столбцы матрицы R являются собственными векторами, $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_{3N}$ — собственные значения, R^T — транспонированная матрица. Собственное значение λ_i представляет собой среднеквадратичное колебание главного компонента $p_i(t)$.

Траектории проецировались на собственные векторы с получением главных компонент:

$$p(t) = R^T M^{1/2} [x(t) - \langle x \rangle]. \quad (3)$$

Для получения данных о свободной энергии миграции 4ГР через бислой использовались подходы управляемой МД и зонтичной выборки. Протокол подробно описан в работе [17]. Для определения термодинамических характеристик связывания ДНК с Dps использовался метод поиска линейной энергии взаимодействия (Linear Interaction Energy (LIE)) [72, 73] с ранее подобранными параметрами [41].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как было показано ранее в экспериментах *in vivo* на примере штаммов бактерии *E. coli* K12 [17] и BL21-Gold(DE3)/pET-Dps (с индукцией и без индукции белка Dps) [41], эти бактерии чувствительны к присутствию 4ГР.

Эффект от внесения 4ГР на предстационарной стадии роста в клеточную культуру *E. coli* штамма K12 являлся дозозависимым и развивался во времени. 4-Гексилрезорцин в концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} М повышал стрессоустойчивость клеток и их способность к сохранению жизнеспособности. Внешний вид клеток при фазово-контрастной микроскопии не изменялся по сравнению с контролем. Более высокие концентрации 4ГР

($10^{-4} \div 2 \cdot 10^{-4}$ М) вызывали переход большей части популяции в анабиотическое покоящееся состояние. Бактериальные клетки постепенно становились более мелкими, округлыми, с резко очерченными клеточными стенками. При этом бактерии оставались жизнеспособными при хранении в течение месяца. После отмывки от 4ГР их титр жизнеспособности восстанавливался до 50% от первоначального. Внесение 4ГР в высокой концентрации 4ГР (10^{-3} М) в течение 30 мин приводило к лизису части бактериальной популяции. Оставшиеся клетки становились похожими на споры: округлялись, уменьшались в размерах в 2 и более раз, приобретали способность сильно преломлять свет, их клеточные оболочки утолщались. Они сохраняли свою форму и содержание (не разрушались в дальнейшем), отмывка от 4ГР не восстанавливала их жизнеспособность. Это состояние клеток описано как мумифицированное [74].

Жизнеспособность и стрессоустойчивость бактериальных клеток *E. coli* штамма BL21-Gold(DE3)/pET-Dps с обычным и избыточным количеством белка Dps, выращенных в присутствии растворов 4ГР, также оказывались подвержены влиянию концентрации этого ауторегулятора. Было исследовано шесть популяций штамма BL21-Gold(DE3)/pET-Dps в разных условиях. Две популяции были выращены в присутствии 10^{-4} М 4ГР, две — в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ М 4ГР и две контрольные — в отсутствие 4ГР. Между собой популяции в каждой паре различались количеством белка Dps, образующегося в процессе перехода клеток в стационарную фазу. В первом случае его содержание было обычным ($\sim 1.8 \cdot 10^5$ молекул на клетку). Во втором случае оно было увеличенным в 8–12 раз путем добавления 10^{-3} М лактозы, что вызывало сверхсинтез белка Dps, кодируемого имеющейся в мутантном штамме плазмидой. Показано, что жизнеспособность и стрессоустойчивость бактерий напрямую зависит от концентрации в клетках как 4ГР, так и белка Dps. Внесение 4ГР при развитии клеток без дополнительного стимулирования синтеза белка Dps приводило к образованию бактериальных популяций, более устойчивых к длительному хранению в условиях стресса голодания и температурного стресса. При температурном стрессе стрессоустойчивость увеличивалась симбатно концентрациям 4ГР и Dps, где большее влияние оказывала концентрация белка, а не 4ГР.

Таким образом, 4ГР обладает комплексным воздействием на бактериальную клетку. Первым препятствием для него является наружная клеточная мембрана. Среди двух возможных путей проникновения в клетку: через пориновые каналы и бислой, 4ГР предпочтительно мигрирует через бислой. Это происходит вследствие того, что

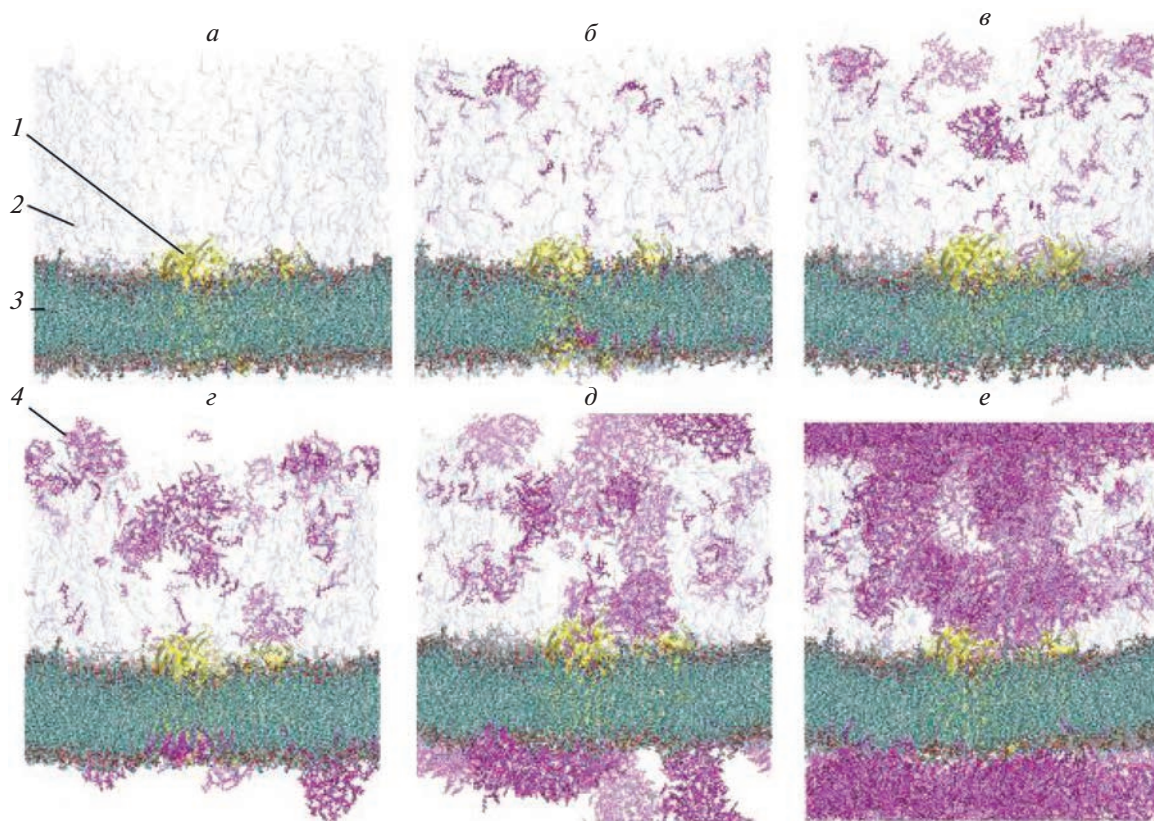


Рис. 1. Структуры систем наружной мембраны на момент времени, соответствующий 100 нс, без 4ГР (а), в присутствии 110 (б), 250 (в), 450 (г), 1000 (д) и 2250 молекул 4ГР (е). Цифрами обозначены: 1 – тример белка порина, 2 – область полисахаридов внешнего слоя наружной мембраны, 3 – липидный бислой, 4 – молекулы 4ГР.

это соединение имеет длинный гидрофобный углеводородный остаток, которым связывается с петлей L6 (P₂₃₉ ITNKFTNTSGF₂₅₀) порина, переводя канал в закрытое состояние. Рассчитанные методом зонтичной выборки с использованием модели внутренней мембраны величины энергетических барьеров на профиле свободной энергии миграции 4ГР составляют для бислоя 19 кДж/моль, для открытого канала порина – 32 кДж/моль. Предпочтительное взаимодействие с теми или иными частями наружной мембраны зависит от концентрации 4ГР. Стоит отметить, что 4ГР плохо растворим в воде. В микробиологических экспериментах его предварительно растворяют в этаноле. При МД-расчетах молекулы помещаются равномерно в области водного окружения. Тем не менее в течение 10–20 нс происходит кластеризация 4ГР. При больших концентрациях молекулы образуют массивные мицеллы, в которых гидрофобные части (гексилы) направлены внутрь, а гидрофильные (резорцины) – наружу. Возможность образования мицелл максимальна в воде и снижается в биосистемах нелинейно при изменении концентрации 4ГР и по-разному в зависимости от состава системы.

На рис. 1 показаны структуры систем наружной мембраны со встроенным тримером белка порина без добавления 4ГР и в присутствии 110, 250, 450, 1000 и 2250 молекул этого соединения. Количество молекул добавленного 4ГР приблизительно отвечает следующим концентрациям в микробиологических экспериментах: 10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$ и 10^{-3} М соответственно. Без 4ГР (рис. 1а) толщина мембраны практически постоянна в области как липидного бислоя, так и полисахаридов. Основными центрами связывания 4ГР при его низких концентрациях (рис. 1б, в) оказываются О-антигены. Метастабильные комплексы с остатками сахаров О-антигенов и центрального олигосахарида способствуют продвижению молекул 4ГР к липиду А наружной мембраны бактерии *E. coli*. При низких и средних концентрациях 4ГР (рис. 1б–г) последний выталкивается из воды и взаимодействует с гидрофобными аминокислотными остатками порина. При дальнейшем увеличении концентрации 4ГР (рис. 1д, е) он адсорбируется на липидах и образует плотный слой, практически равный по толщине бислою.

Плотность распределения атомов 4ГР по отношению к порину и бислою в зависимости от кон-

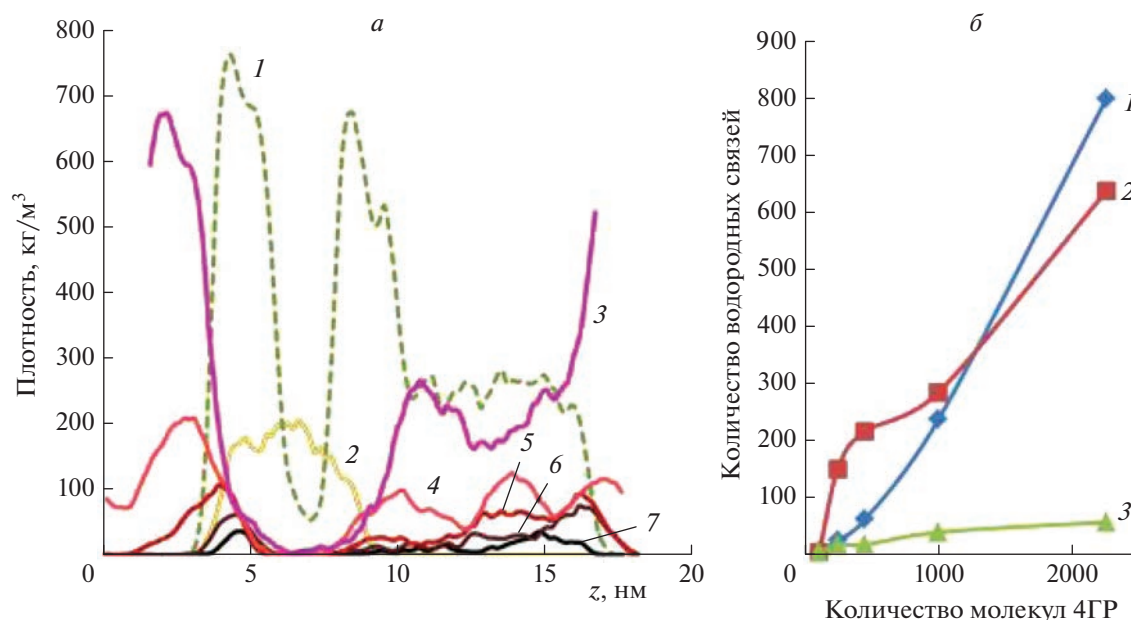


Рис. 2. *a* — Плотность распределения атомов (по массе) различных молекул внутри расчетной ячейки по оси z (нормаль к плоскости мембраны) для модели внешней мембраны *E. coli*: 1 — липиды, 2 — порин, 3–7 — 4ГР при следующем числе молекул на ячейку: 3 — 2250, 4 — 1000, 5 — 450, 6 — 250, 7 — 110; *б* — количество водородных связей молекул 4ГР с другими молекулами 4ГР (1), липидами и липополисахаридами (2) и порином (3).

центрации 4ГР показана на рис. 2*a* (от 0 до 7 нм по оси абсцисс — внутренняя сторона мембраны, далее — внешняя). Толщина слоя 4ГР у мембраны (z) варьирует от 2 нм при низком содержании 4ГР до 8–8.5 нм при содержании 1000 и 2250 молекул на расчетную ячейку. Толщина мембраны (липиды и липополисахариды) остается постоянной вне зависимости от количества добавленного 4ГР. Параметры порядка липидов в обеих мембранах изменяются нелинейно в зависимости от концентрации 4ГР. Площадь, приходящаяся на липид, для наружной мембраны при температуре 310 К составляла $60.7 \text{ \AA}^2$ и увеличивалась до $61.8 \text{ \AA}^2$ при добавлении средних концентраций 4ГР за счет встраивания молекул в области соединения липидных хвостов и головок. Высокие концентрации 4ГР приводили к уменьшению приходящейся на липид площади до $57.6 \text{ \AA}^2$ за счет образования слоя 4ГР на поверхности мембраны и стягивания липидных головок. Радиус гирации белка порина незначительно повышается от $R_g = (3.076 \pm 2.1) \cdot 10^{-5} \text{ нм}$ (110 молекул 4ГР) до $R_g = (3.078 \pm 2.7) \cdot 10^{-5} \text{ нм}$ (250 и 450 молекул 4ГР) и несколько снижается до $R_g = (3.06 \pm 2.1) \cdot 10^{-5} \text{ нм}$ (1000 и 2250 молекул 4ГР). Порин содержит как участки, образованные гидрофильными аминокислотными остатками, экспонированными наружу, так и внутримембранные гидрофобные участки. Гидрофильные участки могут взаимодействовать с 4ГР через водородные связи, в то время как между алкильным радикалом резорци-

на и неполярными остатками белка наблюдаются гидрофобные взаимодействия (структура образующихся комплексов будет рассмотрена ниже). На рис. 2*б* показано количество водородных связей, образуемых молекулами 4ГР с другими молекулами 4ГР (кривая 1), липидами и липополисахаридами (кривая 2), порином (кривая 3). Липиды (липополисахариды) препятствуют образованию массивных комплексов 4ГР путем связывания отдельных молекул 4ГР на всем протяжении мембраны. Только при количестве 4ГР, составляющем 2250 молекул на расчетную ячейку, число водородных связей между молекулами 4ГР становится выше, чем между 4ГР и липидами.

Таким образом, 4ГР взаимодействует как с полисахаридными остатками внешней мембраны, так и с мембранными белками и липидами мембран. Проникая сквозь внешнюю мембрану, 4ГР способен абсорбироваться пептидогликаном, меняя его форму и размеры, растягивая и сужая его в различных направлениях и частично проходя к внутренней мембране, через которую проникает внутрь клетки. Находясь в цитоплазме, молекулы ауторегулятора могут взаимодействовать с находящимися там молекулами и внутриклеточными структурами, среди которых особенно важна молекула ДНК.

Исследование динамики ДНК проводили как в растворе, так и у поверхности Dps. Добавление небольших концентраций 4ГР (2 : 1) к ДНК в растворе приводило к встраиванию одиночных мо-

лекул в малую и большую бороздки без изменения структуры ДНК. Взаимодействие молекул 4ГР с ДНК осуществлялось путем образования связи $O-H\cdots O^- - R$ гидроксильной группы резорцина и фосфатной группы ДНК. При встраивании 4ГР в малую бороздку образовывались две связи с обеими цепями ДНК, а время жизни комплекса составляло около 25 нс. Во втором случае 4ГР образовывал одну связь с одной из цепей, и время жизни комплекса было меньшим — около 10 нс. Также было замечено, что в местах разрывов ДНК молекулы 4ГР образуют стэкинг-взаимодействия с остатками нуклеотидов.

Изучение ДНК со стабилизирующим ДНК белком Dps проводили при отсутствии 4ГР и при воздействии 50, 100 и 500 молекул 4ГР. Белок Dps обладает интересными динамическими свойствами. Его шарообразный остов относительно стабилен, в то время как N-концы чрезвычайно подвижны. Тем не менее при образовании комплексов Dps–Dps и ДНК–Dps, помимо N-концевых участков, играют роль и другие экспонированные наружу области молекулы [40]. Как было показано в работе [41], молекулы 4ГР способны изменять молекулярные механизмы связывания ДНК с Dps путем образования мицеллоподобных комплексов 4-гексилрезорцина структур между молекулами ДНК и Dps.

Были построены проекции траекторий движения атомов ДНК (в растворе и в комплексах с Dps) и субъединиц Dps при разном содержании 4ГР на собственные векторы. После чего были выделены среднеквадратичные флуктуации движения атомов относительно главных компонент. Обнаружено, что за наиболее масштабные коллективные колебания отвечают первые четыре главных компоненты, смещения относительно которых рассматривались при анализе результатов и построении отфильтрованных траекторий движения частей систем. Вверху рис. 3а показаны среднеквадратичные флуктуации атомов ДНК (RMSF) относительно первой главной компоненты (вес.1). Обнаружено, что колебания молекулы ДНК, состоящей из 25 пар нуклеотидов, в течение 0.1 мкс не зависят от концентрации 4ГР и практически совпадают с колебаниями свободной ДНК в растворе. Характер колебаний субъединиц додекамера Dps изменяется в зависимости от связывания субъединицы с молекулами ДНК или 4ГР (рис. 3а средние и нижний графики). Для Dps в растворе (в качестве примера приведены типичные графики для трех субъединиц) обращает на себя внимание значительная подвижность N-концевых аминокислотных остатков (порядковые номера с 1 по 10). Присоединение ДНК значительно снижает флуктуации как этих участков, так и атомов всей субъединицы в целом. Адсорбция молекул 4ГР на поверхность Dps может как снижать, так и повышать подвиж-

ность N-концов. На рис. 3а снижение наблюдается в присутствии 50 и 500 молекул 4ГР в ячейке, а повышение — в присутствии 100 молекул. Кроме того, заметен эффект возбуждения колебаний по значительной части внешней поверхности Dps. Особенно ярко он проявляется при средних концентрациях 4ГР (100 молекул на ячейку) и затрагивает экспонированные наружу α -спиральные участки и петли белка (номера аминокислотных остатков от 80 до 105 и от 135 до 145). Такие колебания могут способствовать ускорению связывания ДНК.

Что касается радиуса гирации субъединиц Dps (рис. 3б), усредненного по всем 12 субъединицам, то заметно его уменьшение при добавлении 4ГР в малой концентрации, увеличение до нормального значения при средней концентрации и дальнейшее возрастание при добавлении 4ГР высокой концентрации. При этом изменение радиуса гирации Dps в основном обусловлено подвижными N-концами (с 1-го по 25-й аминокислотный остаток). Без учета этих участков значение $R_g = (1.54 \pm 0.02)$ нм вне зависимости от присутствия 4ГР.

Как и в случае с компонентами клеточной оболочки, 4ГР начинает быстро образовывать водородные связи с ДНК и белком. На рис. 3в показана временная зависимость числа водородных связей молекул 4ГР с ДНК, Dps и другими молекулами 4ГР. Видно, что число связей с ДНК невелико даже при больших концентрациях 4ГР. Что касается Dps, то молекулы 4ГР при его малых и средних концентрациях предпочтительно связываются с белком, а не между собой. Ранее такой же эффект был отмечен для липидов и липополисахаридов. При высоких концентрациях 4ГР его молекулы начинают заметно быстрее связываться между собой, чем с поверхностью Dps. Однако в течение 0.1 мкс количество такого типа взаимодействий выравнивается и достигает примерно 100.

Потенциальная энергия взаимодействия Dps с ДНК в расчете на одну пару оснований ДНК (рис. 3г, кривая 1) остается практически постоянной при отсутствии 4ГР и при его добавлении в разных концентрациях. Наиболее сильное связывание Dps и ДНК наблюдается для системы, в которую добавлены 50 молекул 4ГР. Средняя потенциальная энергия взаимодействия Dps с 4ГР увеличивается (рис. 3г, кривая 2). Это говорит о том, что молекулы 4ГР не распределяются по поверхности белка равномерно. Свободная энергия связывания ДНК с Dps, полученная методом поиска LIE, изменяется от $\Delta G = -49$ кДж/моль при отсутствии 4ГР, несколько увеличивается (оставаясь отрицательной) и затем снижается до $\Delta G = -150$ кДж/моль при введении 500 молекул 4ГР (рис. 3г, кривая 3). Эффект увеличения ΔG при малых и средних концентрациях 4ГР наблюдается

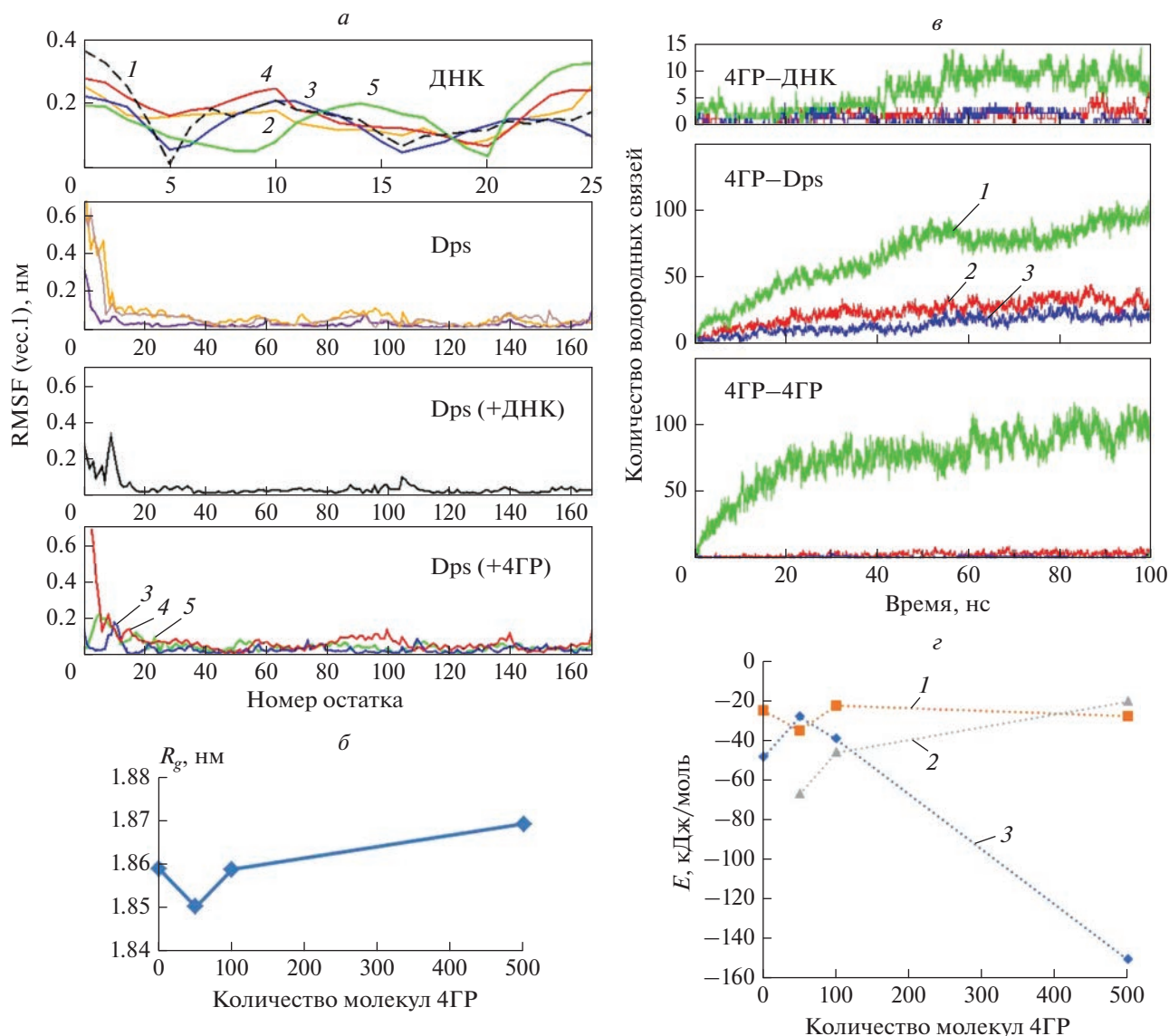


Рис. 3. а – Среднеквадратичные флуктуации атомов ДНК, субъединицы Dps при связывании с ДНК, субъединиц Dps в растворе и субъединиц Dps при адсорбции 4ГР. Цифрами обозначены графики для: 1 – ДНК в растворе, 2 – молекул без добавления 4ГР, 3 – в присутствии 50, 4 – 100, 5 – 500 молекул 4ГР; б – изменение среднего радиуса гирации субъединицы Dps при увеличении содержания 4ГР; в – количество водородных связей, образуемых молекулами 4ГР с ДНК, Dps и другими молекулами 4ГР, в зависимости от времени при расчете системы Dps с ДНК в присутствии 500 (1), 100 (2) и 50 молекул 4ГР (3); г – потенциальная энергия взаимодействия Dps с ДНК в расчете на одну пару оснований ДНК (1), потенциальная энергия взаимодействия Dps с 4ГР в расчете на одну молекулу 4ГР (2), свободная энергия связывания ДНК с Dps, полученная методом поиска LIE (3).

вследствие того, что происходит перераспределение вкладов электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий (в методе LIE они учитываются с разными весами). Поэтому качественно можно сказать, что при любой из исследованных концентраций 4ГР образование комплексов ДНК–Dps энергетически выгодно. Высокие концентрации ауторегулятора приводят к образованию сверхстабильных комплексов с ДНК. Это может препятствовать последующему освобождению

ДНК от белка Dps, влекущему за собой нарушение процессов репликации и транскрипции ДНК, что ведет к гибели клетки.

На рис. 4 показаны структуры комплексов Dps, ДНК–Dps, порина и пептидогликана с 4ГР. Как было обнаружено ранее, 4ГР образует водородные связи с поверхностью цитоплазматических белков через молекулы гидратной воды [56–58]. Связывание с Dps происходит как непосредственно, так и главным образом через гидратную

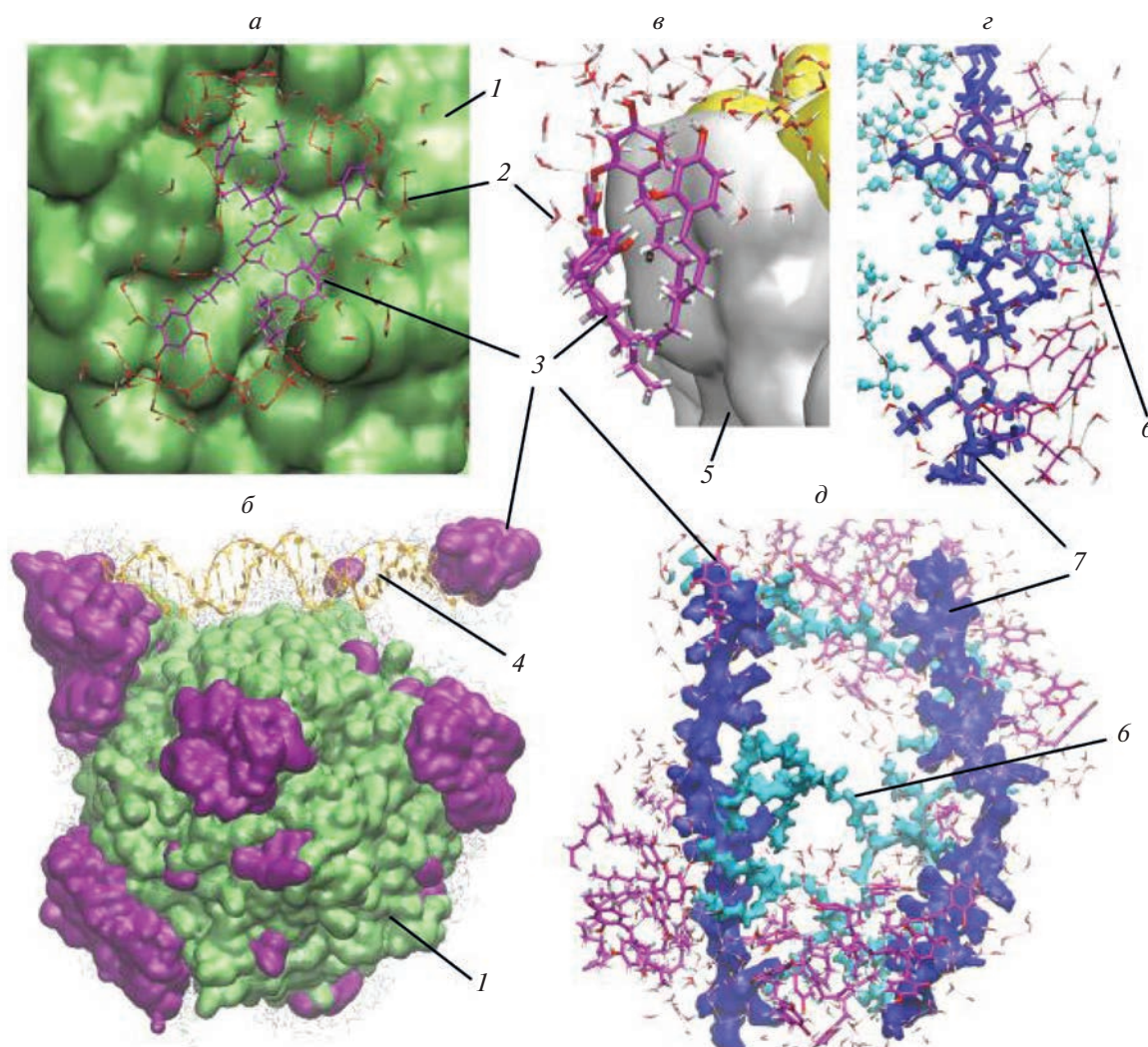


Рис. 4. Структура комплексов 4ГР с цитоплазматическим белком Dps (*а, б*), мембранным белком порином (*в*) и пептидогликаном (*г, д*). Цифрами обозначены: 1 – поверхность белка Dps, 2 – молекулы воды, 3 – молекулы и комплексы 4ГР, 4 – ДНК, 5 – поверхность белка порина, 6 – пептидные фрагменты, 7 – углеводные цепи пептидогликана. Тонкими линиями между молекулами обозначены водородные связи.

воду на поверхности белка. На рис. 4*а* показан комплекс из пяти молекул 4ГР, взаимодействующих между собой через алкильные концы. Комплекс связывается с поверхностью Dps посредством цепочки водородных связей с молекулами гидратной воды. Гидрофобный центр комплекса взаимодействует с неполярными аминокислотными остатками Dps. При увеличении концентрации массивные “мицеллы” 4ГР неравномерно адсорбируются на поверхности Dps (рис. 4*б*). Молекулы 4ГР образуют стеклинг-взаимодействия с концевыми остатками ДНК, что приводит к появлению “мицелл” 4ГР на концах ДНК.

Поверхность белка порина гидрофобна внутри мембраны и гидрофильна в экспонированных наружу частях белка. Молекулы 4ГР взаимодейству-

ют с гидрофильными областями посредством гидратной воды и затем смещаются внутрь мембраны между липидами и белком. Здесь основную роль играют гидрофобные взаимодействия. Вверху рис. 4 показан гидрофильный участок белка и воды, ниже видны молекулы 4ГР, непосредственно взаимодействующие с внутримембранной областью белка.

Связывание одиночных молекул 4ГР с поверхностью пептидогликана (рис. 4*г*) происходит через гидратную воду. Оно начинается со связывания остатков углеводов. При росте кластеров 4ГР (рис. 4*д*) они смещаются в область пептидов, где образуют многочисленные водородные связи с поверхностью опосредованно через молекулы воды.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Расчеты, проведенные методом классической молекулярной динамики, показывают, что ауто-регулятор 4ГР способен связываться и оказывать непосредственное влияние как на биополимеры оболочки бактериальной клетки — липополисахариды, белки, пептидогликан, так и на цитоплазматические — белки и ДНК.

Среди двух возможных путей проникновения в клетку: через пориновые каналы и бислои, 4ГР предпочтительно мигрирует через бислой. Он взаимодействует как с полисахаридными остатками внешней мембраны, так и с мембранными белками и липидами мембран. Толщина слоя 4ГР у наружной мембраны варьирует от 2 нм при низкой концентрации 4ГР до 8–8.5 нм при высокой. Гидрофобные взаимодействия 4ГР с трансмембранными областями белка порина определяют его проникновение в бислой на границе порин-липиды.

Проникая через наружную мембрану, 4ГР способен абсорбироваться пептидогликаном. Начальными сайтами связывания являются остатки углеводов. По мере роста комплексов молекулы 4ГР смещаются в область пептидов, изменяя форму и размер пептидогликана за счет растяжения и сжатия в различных направлениях.

При взаимодействии с ДНК 4ГР способен встраиваться в большую и малую бороздки, образуя связи $O-H\cdots O-P$ между гидроксильной группой резорцина и фосфатной группой ДНК. Время жизни таких комплексов составляет 10–25 нс. С концевыми остатками ДНК образуются стекинг-взаимодействия, в результате чего возникают комплексы 4ГР на концах цепи.

Присоединение ДНК значительно снижает флуктуации атомов Dps. Адсорбция же молекул 4ГР на поверхность Dps может как снижать, так и повышать подвижность N-концов, но сильно (особенно при средних концентрациях 4ГР) возбуждает колебания на значительной части внешней поверхности Dps. Такие колебания могут способствовать ускорению связывания ДНК. Свободная энергия связывания ДНК с Dps, полученная методом поиска линейной энергии взаимодействия изменяется от $\Delta G = -49$ кДж/моль при отсутствии 4ГР, несколько увеличивается (оставаясь отрицательной) при малых концентрациях 4ГР и затем снижается до $\Delta G = -150$ кДж/моль при его больших концентрациях.

Таким образом, ауторегулятор 4ГР способен модулировать динамическое поведение исследованных компонентов бактериальной клетки. Эффект зависит от концентрации этого вещества. Это согласуется с экспериментальными данными о том, что при малых и средних концентрациях 4ГР увеличивается стрессоустойчивость бактерий. В то время как при больших концентрациях

ауторегулятора происходит образование устойчивых, но нежизнеспособных форм.

Расчеты проводили на высокопроизводительной вычислительной системе МВС-10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре Российской академии наук (МЦ РАН).

Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки России по теме FFZE-2022-0011 (регистрационные номера 122040400089-6 и 122040800164-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005.
2. Ткаченко А.Г. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов. Екатеринбург: УрО РАН, 2012.
3. Nair S., Finkel S.E. // J. Bacteriol. 2004. V. 186. № 13. P. 4192; <https://doi.org/10.1128/JB.186.13.4192-4198.2004>
4. De Martino M., Ershov D., van den Berg P.J., Tans S.J., Meyer A.S. // Ibid. 2016. V. 198. № 11. P. 1662; <https://doi.org/10.1128/JB.00239-16>
5. Levinson W.E. Review of Medical Microbiology and Immunology. 11th ed. N.Y.: McGraw-Hill Medical, 2010.
6. Raetz C.R.H., Whitfield C. // Annu. Rev. Biochem. 2002. V. 71. 635e700.
7. Ultee E., Ramijan K., Dame R.T., Briegel A., Claessen D. // Adv. Microb. Phys. 2019. V. 97. P. 141; <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2019.02.001>
8. Delhaye A., Collet J.F., Laloux G. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2019. V. 9. P. 380; <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00380>
9. Cabeen M.T., Jacobs-Wagner C. // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 3. № 8. P. 601; <https://doi.org/10.1038/nrmicro1205>
10. Rojas E.R., Billings G., Odermatt P.D. et al. // Nature. 2018. V. 559. P. 617; <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0344-3>
11. Баснакьян И.А. Стресс у бактерий. М.: Медицина, 2003.
12. Revitt-Mills S.A., Wright E.K., Vereker M. et al. // MicrobiologyOpen. 2022. V. 11. № 5. P. e1316; <https://doi.org/10.1002/mbo3.1316>
13. Maier L., Pruteanu M., Kuhn M. et al. // Nature. 2018. V. 555. P. 623; <https://doi.org/10.1038/nature25979>
14. McGlynn P., Savery N.J., Dillingham M.S. // Mol. Microbiol. 2012. V. 85. № 12. P. 20; <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08102.x>
15. Pennington J.M., Rosenberg S.M. // Nat. Genet. 2007. V. 39. P. 797; <https://doi.org/10.1038/ng2051>
16. Nikolaev Y.A., Tutel'yan A.V., Loiko N.G. et al. // PLOS One. 2020. V. 15. № 9. e0239147; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239147>
17. Терешкин Э.В., Лойко Н.Г., Терешкина К.Б., Крупнянский Ю.Ф. // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 11. С. 48.

18. Windels E.M., Van den Bergh B., Michiels J. // PLOS Pathog. 2020. V. 16. № 5. e1008431; <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008431>
19. Amemiya H.M., Schroeder J., Freddolino P.L. // Transcription. 2021. V. 12. № 4. P. 182; <https://doi.org/10.1080/21541264.2021.1973865>
20. Shen B.A., Landick R. // J. Mol. Biol. 2019. V. 431. № 20. P. 4040; <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.041>
21. Molan K., Žgur Bertok D. // Intern. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 7. P. 4008; <https://doi.org/10.3390/ijms23074008>
22. Minsky A., Shmoni E., Frenkiel-Krispin D. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2002. V. 3. № 1. P. 50; <https://doi.org/10.1038/nrm700>
23. Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A. et al. // PLOS One. 2020. V. 15. № 10. e0231562; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231562>
24. Крупянский Ю.Ф. // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 3. С. 60; <https://doi.org/10.31857/S0207401X21030079>
25. Крупянский Ю.Ф., Коваленко В.В., Лойко Н.Г. и др. // Биофизика. 2022. Т. 67. № 4. С. 638; <https://doi.org/10.31857/S0006302922040020>
26. Almiron M., Link A.J., Furlong D., Kolter R. // Genes Dev. 1992. V. 6. P. 2646.
27. Karas V.O., Westerlaken I., Meyer A.S. // J. Bacteriol. 2015. V. 197. № 19. P. 3206.
28. Calhoun L., Kwon Y. // J. Appl. Microbiol. 2011. V. 110. P. 375; <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04890.x>
29. Battesti A., Majdalani N., Gottesman S. // Annu Rev Microbiol. 2011. V. 65. P. 189; <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102946>
30. de la Garza-García J.A., Ouahrani-Bettache S., Lyon-nais S. et al. // Front. Microbiol. 2021. V. 12. P. 794535; <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.794535>
31. Algu K., Choi V.S.C., Dharni R.S., Duncan D.A.K. // J. Exp. Microbiol. Immunol. 2007. V. 11. P. 60.
32. Grant R.A., Filman D.J., Finkel S.E. et al. // Nat. Struct. Biol. 1998. № 5. P. 294.
33. Frenkiel-Krispin D., Minsky A // Ibid. 2006. V. 156. P. 311.
34. Лойко Н.Г., Сузина Н.Е., Соина В.С. и др. // Микробиология. 2017. Т. 86. № 6. С. 703.
35. Kovalenko V., Popov A., Santoni G. et al. // Acta Cryst. 2020. V. F76. P. 568.
36. Синицын Д.О., Лойко Н.Г., Гуларян С.К. и др. // Хим. физика. 2017. Т. 36. № 9. С. 59
37. Moiseenko A., Loiko N., Tereshkina, K. et al // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2019. V. 517. № 3. P. 463.
38. Tereshkin E.V., Tereshkina K.B., Krupyanskii Y.F. // JPCS. 2021. V. 2056. № 1. P. 012016.
39. Tereshkin E., Tereshkina K., Loiko N. et al. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2018. V. 37. P. 2600.
40. Терешкин Э.В., Терешкина К.Б., Коваленко В.В. и др. // Хим. физика. 2019. V. 38. № 40. С. 48.
41. Tereshkin E.V., Loiko N.G., Tereshkina K.B., Kovalenko V.V., Krupyanskii Y.F. // Rus. J. Phys. Chem. B. 2022. V. 16. № 4. P. 726; <https://doi.org/10.1134/S1990793122040285>
42. Терешкина К.Б., Лойко Н.Г., Терешкин Э.В. и др. // Акту. вопр. биологич. физики и химии. 2022. Т. 7. № 2. С. 235.
43. Lacqua A., Wanner O., Colangelo T., Martinotti M.G., Landini P. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 956.
44. Li H., Wang B.C., Xu W.J., Lin X.M., Peng X.X. // J. Proteome Res. 2007. V. 7. P. 4040.
45. Sueki A., Stein F., Savitski M.M., Selkrig J., Typas A. // mSystems. 2020. V. 5. № 2. P. e00808-19; <https://doi.org/10.1128/mSystems.00808-19>
46. Davis M.M., Brock A.M., DeHart T.G. et al. // PLOS Pathog. 2021. V. 17. № 5. e1009546; <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009546>
47. Howe C., Ho F., Nenninger A., Raleiras P., Stensjö K. // J. Biol. Chem. 2018. V. 293. Issue 43. P. 16635; <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002425>
48. Theoret J.R., Cooper K.K., Zekarias B. et al. // Clin Vaccine Immunol. 2012. V. 19. № 9. P. 1426; <https://doi.org/10.1128/CI.00151-12>
49. Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А. и др. // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 446.
50. Kozubek A., Tyman J.H. // Chem Rev. 1999. V. 99. № 1. P. 1; <https://doi.org/10.1021/cr970464o>
51. Лойко Н.Г., Кряжевских Н.А., Сузина Н.Е. и др. // Микробиология. 2011. Т. 80. № 4. С. 465.
52. Терешкин Э.В., Терешкина К.Б., Крупянский Ю.Ф. // Акту. вопр. биологич. физики и химии. 2020. Т. 5. № 4. С. 619.
53. Лойко Н.Г., Мулюкин А.Л., Козлова А.Н. и др. // Прикл. биохим. и микробиол. 2009. Т. 45. № 2. С. 181.
54. Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Никитин А.И., Эль-Регистан Г.И. // Микробиология. 2005. Т. 74. № 5. С. 616.
55. Мулюкин А.Л., Сорокин В.В., Лойко Н.Г. и др. // Микробиология. 2002. Т. 71. № 1. С. 37.
56. Крупянский Ю.Ф., Нокс П.П., Лойко Н.Г. и др. // Биофизика. 2011. Т. 56. № 1. С. 13.
57. Крупянский Ю.Ф., Абдулнасыров Э.Г., Лойко Н.Г. и др. // Хим. физика. 2012. Т. 31. № 3. С. 60.
58. Терешкина К.Б., Степанов А.С., Синицын Д.О., Крупянский Ю.Ф. // Хим. физика. 2014. Т. 33. № 7. С. 64; <https://doi.org/10.7868/S0207401X14070139>
59. Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Зеленихин П.В. и др. // Микробиология. 2002. Т. 71. № 2. С. 194
60. Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Эль-Регистан Г.И. // Микробиология. 2006. Т. 75. № 5. С. 662.
61. Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Эль-Регистан Г.И. // Там же. 2006. Т. 75. № 5. С. 654
62. Gupta D.S. // J. Bacteriology. 1992. V. 174. № 24. P. 7963.
63. Szatmári D., Sárkány P., Kocsis B. et al. // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 12002
64. Sohlenkamp C., Geiger O. // FEMS Microbiol. Rev. 2016. V. 40. № 1. P. 133.
65. Cowan S.W., Garavito R.M., Janssonius J.N. et al. // Structure. 1995. V. 3. № 10. P. 1041.

66. *Labischinski H., Goodell E.W., Goodell A., Hochberg M.L.* // J. Bacteriol. 1991. V. 173. № 2. P. 751; <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.751-756.1991>
67. *Gan L., Chen S., Jensen G.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. Issue 48. P. 18953; <https://doi.org/10.1073/pnas.0808035105>
68. *Hess B., Kutzner C., van der Spoel D., Lindahl E.* // J. Chem. Theory Comput. 2008. V. 4. P. 435.
69. *Granovsky A.A.* Firefly version 8.2.0; <http://classific.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>
70. *Humphrey W., Dalke A., Schulten K.* // J. Mol. Graph. 1996. V. 14. № 1. P. 33.
71. *Amadei A., Linssen A.B., Berendsen H.J.* // Proteins. 1993. V. 17. № 4. P. 412; <https://doi.org/10.1002/prot.340170408>
72. *Aqvist J., Marelus J.* // Comb. Chem. High Throughput Screening. 2001. V. 4. P. 613.
73. *Hansson T., Marelus J., Aqvist J.* // J. Comput. Aided Mol. Des. 1998. V. 12. P. 27.
74. *Сузина Н.Е., Мулюкин А.Л., Лойко Н.Г. и др.* // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 776.