

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*

**Медведев Кирилл Евгеньевич**

**КОМПЬЮТЕРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВЫСОКОГО  
ДАВЛЕНИЯ И ТЕМПЕРАТУРЫ НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИЮ РНК-  
СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА СЕМЕЙСТВА NIP7 АРХЕЙ**

**Специальность:**

03.01.09 – математическая биология, биоинформатика

**Диссертация**

**на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

Научный руководитель -  
к.б.н., доцент Афонников Дмитрий Аркадьевич

Новосибирск

2014

## Оглавление

Оглавление .....	2
Список сокращений.....	5
Введение .....	6
Глава 1. Обзор литературы .....	14
1.1. Живые системы в условиях высоких давлений.....	14
1.2. Влияние высокого давления на функции живых систем.....	17
1.2.1. Влияние высокого давления на физиологические процессы микроорганизмов.....	17
1.2.2. Влияние высокого давления на метаболизм белков .....	20
1.2.3. Влияние высокого давления на мембранные белки.....	20
1.3. Влияние высокой температуры на функции живых систем.....	23
1.3.1. Гипертермофильные микроорганизмы – основа биотехнологий. ....	23
1.3.2. Молекулярные адаптации и влияние температуры на метаболизм белков. ....	25
1.3.3. Термостабильность белков. ....	26
1.3.4. Термодинамическая стабильность белков. ....	27
1.3.5. Кинетическая стабильность белков. ....	28
1.3.6. Сравнение стабильности мезофильных и термофильных белков. ....	29
1.4. Влияние повышенных давлений на структуру и функцию белков .....	30
1.5. Изучение влияние высокой температуры и давления на структуры белков методами молекулярной динамики .....	37
1.5.1. Теоретические основы молекулярной динамики .....	37
1.5.2. Протокол молекулярно-динамического эксперимента.....	42
1.5.3. Моделирование молекулярной динамики белка <i>in silico</i> .....	43
1.5.4. Изучение термостабильности белков методами молекулярной динамики .....	46
1.5.5. Моделирование белков в условиях повышенных давлений .....	49
1.6. Краткая характеристика архей рода <i>Rugosoccus</i> .....	53
1.7. Белок Nip7 <i>Rugosoccus abyssi</i> .....	54
1.8. PUA домен.....	56
1.9. Функции белка Nip7 и его близких гомологов. ....	59
1.10. Методы сравнительного анализа аминокислотных последовательностей для выявления механизмов адаптаций белков к экстремальным условиям. ....	61
1.10.1. Анализ аминокислотного состава белков термофильных и мезофильных организмов .....	61

1.10.2. Анализ аминокислотных остатков специфичных к температуре и давлению у термофильных и мезофильных организмов.....	64
1.11. Заключение по обзору литературы и постановка задачи исследования .....	69
Глава 2. Материалы и методы .....	70
2.1. Модели белков .....	70
2.2. Подготовка моделей к моделированию молекулярной динамики .....	72
2.3. Моделирование молекулярной динамики.....	73
2.4. Сравнение моделей и оценка подвижности полипептидной цепи .....	74
2.5. Анализ вторичной структуры.....	74
2.6. Зависимость конформационных параметров моделей от температуры, давления и белковой последовательности.....	75
2.7. Анализ солевых мостиков.....	77
2.8. Визуализация трехмерных структур .....	77
2.9. Статистический анализ .....	78
2.10. Предсказание сайтов белок-белковых взаимодействий .....	78
2.11. Поиск и выравнивание гомологичных белков архей.....	78
Глава 3. Молекулярное моделирование белковых структур Nip7 глубоководного и мелководного организмов.....	80
3.1. Стабильность моделей белков.....	80
3.2. Взаимодействие с растворителем .....	83
3.3. Локальная структура полипептидной цепи .....	86
3.4. Анализ вторичной структуры белка .....	91
3.5. Флуктуации полипептидной цепи .....	95
3.6. Анализ солевых мостиков.....	99
3.7. Влияние типа белка на динамику белковой структуры.....	103
3.8. Эффект влияния температуры и давления на структуру и динамику белка Nip7 ...	105
3.9. Влияние высокого давления и температуры на функцию белка Nip7 .....	109
3.10. Различия в динамики белков мелководного и глубоководного организмов и их эволюционное значение .....	111
Глава 4. Поиск мутаций, связанных с адаптацией к экстремальным условиям в белках Nip7 архей .....	118
4.1. Анализ специфичных позиций.....	118
Заключение.....	133
Выводы .....	135
Список литературы:.....	136

Приложение №1 .....	157
Приложение №2 .....	165
Приложение №3 .....	166
Приложение №4 .....	169
Приложение №5 .....	174
Приложение №6 .....	181
Приложение №7 .....	189
Приложение №8 .....	193
Приложение №9 .....	205
Приложение №10 .....	208

## Список сокращений:

МД - Молекулярная динамика

Rg - Радиус гирации (Radius of gyration)

RMSD - Среднеквадратичное отклонение C $\alpha$  атомов (Root mean squared deviation)

RMSF - Среднеквадратичные флуктуации (Root mean squared fluctuation)

RMSDL - Локальное среднеквадратичное отклонение C $\alpha$  атомов (Local root mean squared deviation)

SAS - Поверхность доступная растворителю (Solvent accessible surface)

NIP7-ABY - модель белка Nip7 глубоководной археи *Pyrococcus abyssi*

NIP7-FUR - модель белка Nip7 мелководной археи *Pyrococcus furiosus*

## Введение

### Актуальность проблемы

Высокие температуры и давления являются повреждающими факторами для живых клеток. Для человека и большинства известных нам организмов оптимальными являются условия температуры близкой к 27 С (300 К) и атмосферного давления (1 атм = 0.1 МПа). Однако на земле существуют организмы, которые заселяют местообитания с условиями, которые для человека являются экстремальными, например, температурой около 100 С (373 К) и давлениями выше 20 Мпа (в 200 раз больше атмосферного). Такие условия наблюдаются вблизи глубоководных гидротермальных источников, заселенных сообществами микроорганизмов-экстремофилов (Rothschild & Mancinelli, 2001).

Механизмы, обеспечивающие выживание клеток в таких условиях остаются до конца не ясными. Их понимание позволит дать ответ на ряд фундаментальных вопросов, связанных с происхождением жизни и эволюцией микроорганизмов на ее ранних этапах (Daniel *et al.*, 2006) и адаптацией к условиям различных экологических ниш (Brooks *et al.*, 2011). В частности, актуальной задачей является выявление молекулярных механизмов эволюционной адаптации геномов и протеомов живых организмов к условиям высоких температур (Sternner and Liebl, 2001; Makarova *et al.*, 2003; Berezovsky *et al.*, 2007; McDonald, 2010; Jollivet *et al.*, 2012) и давлений (DiGuilio, 2005; Simonato *et al.*, 2006; Campanaro *et al.*, 2008). При этом одной из центральных фундаментальных задач в этих исследованиях является задача выявления механизмов адаптации структуры и функции белка к экстремальным условиям (прежде всего, к повышенным температурам и давлениям).

Немаловажен прикладной аспект этих исследований: их результаты могут быть использованы для создания ферментов, обладающих новыми свойствами, важными для биотехнологий (Podar & Reysenbach, 2006; Frock &

Kelly, 2012). Ферменты такого рода востребованы в промышленности (Jaenicke *et al.*, 1998; Turner *et al.*, 2007; Scandurra *et al.*, 1998) так как химические реакции, протекающие при более высоких температурах, имеют более высокие скорости, что приводит к их большей эффективности. Кроме того, более термостабильные ферменты позволяют избавиться от нежелательных продуктов реакции, которые разрушаются при повышенных температурах (Vogt *et al.*, 1997). Термостабильные белки часто используются при биологическом анализе, например, в качестве биосенсоров. Для обеспечения повторяемости экспериментов с биосенсорами важно, чтобы ферменты как можно дольше сохраняли нативную структуру; также это позволяет избежать частой перекалибровки биосенсорных устройств. Кроме того, большое значение для фундаментальных исследований представляет оптимизация ДНК-полимераз (Talluri, 2011), которые используются в полимеразных цепных реакциях, в направлении термостабильности, специфичности и процессивности (Breyer *et al.*, 2001).

В последние годы, важную роль в понимании механизмов адаптации белков к экстремальным условиям среды наравне с экспериментальными подходами (см. обзор Liszka *et al.*, 2012) интенсивно используются методы биоинформатики и молекулярного моделирования. Биоинформатический анализ заключается, преимущественно, в сравнительном анализе белковых последовательностей и структур, относящихся к организмам с различными оптимальными условиями температур и давлений (Sternier and Liebl, 2001; Makarova *et al.*, 2003; Berezovsky *et al.*, 2007; Zeldovich *et al.*, 2007; McDonald, 2010; Jollivet *et al.*, 2012). Такое исследование интересно с биологической точки зрения и для понимания эволюционных аспектов реакций адаптивного ответа организмов на физиологический стресс. Вторым теоретическим направлением изучения механизма адаптации белков к экстремальным условиям, является использование методов молекулярного моделирования (Martinez *et al.*, 2011; Lee, 2011; Priyakumar *et al.*, 2010; Tiberti & Papaleo, 2011; Polyansky *et al.*, 2004; Calandrini & Kneller, 2008; Capese *et al.*, 2009; McCarthy

& Grigera, 2006; Laurent *et al.*, 2012). Современные пакеты программ и вычислительные ресурсы позволяют проводить моделирование достаточно больших структур белков на временах десятков нс, что дает возможность детального исследования структурных характеристик моделей белков, как при нормальных, так и при экстремальных параметрах моделирования. Эти методы очень удобны при проведении сравнительного анализа динамических характеристик белков из организмов, обитающих в разных условиях. Они позволяют изучать на атомном уровне структурные различия мезофильных и экстремофильных белков, а также их изменение в процессе моделирования при разных давлениях и температурах. Эти преимущества методов молекулярного моделирования в последнее время привели к росту подобного рода сравнительных исследований, в том числе, влияния мутаций на стабильность белка.

**Целью** настоящей работы являлось изучение влияния высокого давления и температуры на пространственную структуру белка Nip7, участвующего в процессинге РНК у архей методами молекулярной динамики и сравнительного анализа последовательностей и структур.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Методами молекулярной динамики провести моделирование структуры белка Nip7 мелководных и глубоководных архей рода *Pyrococcus* при атмосферном и повышенных давлениях, комнатной и высокой температурах;

2. Разработать подходы для анализа основных структурных характеристик компьютерных моделей белков Nip7 глубоководных и мелководных архей с целью выявления сходства и различий динамического поведения структур этих белков при разных параметрах температуры и давления на основе многофакторного дисперсионного анализа;

3. На основе анализа результатов моделирования выявить различия во флуктуациях доменов белка Nip7, охарактеризовать наиболее подвижные участки и выдвинуть предположение об их функции;

4. Провести поиск специфичных позиций в последовательностях семейства белков Nip7 архей, к таким параметрам среды местообитания как высокая температура и давление;

5. На основе результатов компьютерного анализа сформулировать гипотезу о возможных механизмах адаптации белков Nip7 к экстремальным условиям высоких давлений и температур.

### **Научная новизна**

Впервые проведено моделирование двух гомологичных белков из организмов, принадлежащих различным экологическим нишам при разных температурах (300, 373 К) и давлениях (0.1 – 100 МПа). Для сравнения структурных характеристик белков предложен метод двух и трех-факторного дисперсионного анализа.

Показано что структуры Nip7 *P.abysssi* и *P.furiosus* являются стабильными при всех параметрах температуры и давления, которые были исследованы, что свидетельствует о высокой устойчивости этих белков к экстремальным условиям температур и давлений.

На основе анализа компьютерных моделей белков Nip7 показано, что воздействие высокого давления и температуры на динамические свойства белков происходит неравномерно: наибольшие отклонения структур от кристаллографической модели и флуктуации полипептидной наблюдаются в районах петель; флуктуации С-терминального домена значимо выше, чем N-терминального.

На основе анализа аминокислотного состава, конформационной подвижности полипептидной цепи и компьютерного предсказания сайтов белок-белковых взаимодействий сформулирована гипотеза о вовлеченности аминокислот в позициях 49-59 (спирали  $\alpha_2$ - $\alpha_3$ ) во взаимодействия Nip7 с белками экзосомы.

Выявлены участки полипептидной цепи моделей Nip7, конформационная динамика которых значительно отличается у белков мелководных и глубоководных организмов.

Выявлены позиции белка Nip7, в которых замены аминокислот ассоциированы с изменением температуры и глубины обитания организмов. Показано, что доля таких позиций, ассоциированных с температурой выше, чем с давлением.

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

1. Насыщенность структур белка Nip7 архей рода *Pyrococcus* солевыми мостиками является одним из механизмов его адаптации к экстремальным условиям повышенных температур и давления.

2. В исследованных интервалах значений высокие температуры оказывают более сильное влияние на изменение конформационных характеристик Nip7, чем высокие давления, а в процессе эволюции белков Nip7 их адаптация к высокотемпературным условиям среды более выражена, чем к глубоководным.

### **Апробация работы**

Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях:

- XLVIII Международная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс», Новосибирск, 10 – 14 апреля 2010 г., с.4, устный доклад
- Первая Всероссийская молодёжная научная конференция, посвящённая 125-летию биологических исследований в Томском государственном университете «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биологии», Томск, 6 – 9 октября 2010г., с.132, устный доклад.
- Русско-Индийский семинар "Предсказательная биология, интегративный анализ и методы", 15-19 ноября 2010г., Чандигар, Индия, [http://www.bionet.nsc.ru/meeting/SBGI\\_2010/](http://www.bionet.nsc.ru/meeting/SBGI_2010/), с. 8-9, устный доклад.

- Международная Московская Конференция Вычислительной Молекулярной Биологии (МССМВ-11), Москва, 2011г., с. 227-228, постер.
- Третья школа молодых ученых "Биоинформатика и системная биология", Новосибирск, 2011г., устный доклад.
- II международная научно практическая конференция Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика, 14-17 ноября 2011, Новосибирск, с. 175, постер.
- II международная научно практическая конференция Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика, 14-17 ноября 2011, Новосибирск, с. 114, устный доклад.
- Восьмая Международная Конференция по Биоинформатике Регуляции Генома и Структурной/Системной Биологии (BGRS/SB'2012), Новосибирск, 2012г., с. 203, постер.
- IV Международная конференция «Математическая биология и биоинформатика» (ICMBV-2012), Пущино, 2012г., с. 147-148, устный доклад.
- Пятая Международная школа молодых ученых «Системная Биология и Биоинформатика» (SBV-2013), Новосибирск, 2013г., с. 34, устный доклад.
- Международная Московская Конференция Вычислительной Молекулярной Биологии (МССМВ-2013), Москва, 2013г., постер.
- Девятая Международная Конференция по Биоинформатике Регуляции Генома и Структурной/Системной Биологии (BGRS/SB-2014), Новосибирск, 2014г., с. 105, устный доклад.

### **Основные публикации**

1. **Медведев К.Е.**, Афонников Д.А., Воробьев Ю.Н. Изучение методами молекулярной динамики структур белков NIP7 глубоководных и

мелководных архей в условиях повышенного давления // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2011. – №. 4(16). – С. 136.

2. Афонников Д.А., **Медведев К.Е.**, Гунбин К.В., Колчанов Н.А. Важная роль гидрофобных взаимодействий при адаптации белков к высоким давлениям // Доклады Академии наук. – Академиздатцентр" Наука" РАН. – 2011. – Т. 438. – №. 3. – С. 412-415.

3. **Медведев К.Е.**, Афонников Д.А. Анализ структур белков архей-пьезофилов под влиянием высокого давления с помощью компьютерных методов // Труды Томского государственного университета, сер. Биологическая. – 2011. – Т. 275. – С. 378-380.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, описания используемых материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 211 страницах, содержит 23 рисунка, 6 таблиц и 10 приложений. Библиографический указатель литературы включает 245 источников, из них 4 отечественных и 241 зарубежных.

### **Благодарности**

Автор выражает глубокую признательность сотрудникам лаборатории эволюционной биоинформатики и теоретической генетики ИЦиГ СО РАН, и лично заведующему лабораторией и научному руководителю к.б.н. Афонникову Д.А., а также соавторам и коллегам – академику РАН Колчанову Н.А., к.б.н. Гунбину К.В., д.ф.-м.н. Воробьеву Ю.Н. (Лаборатория исследования модификации биополимеров, ИХБФМ СО РАН), д.х.н. Болдыревой Е.В. (Группа реакционной способности твердых веществ, ИХТТМ СО РАН) за консультации и плодотворные научные дискуссии. Автор благодарит д.ф.-м.н. Чекмареву С.Ф. (Лаборатория моделирования, ИТ СО РАН), к.б.н. Иванисенко В.А. (Лаборатория компьютерной протеомики,

ИЦиГ СО РАН), к.ф.-м.н. Ломзова А.А. (Лаборатория бионанотехнологий, ИХБФМ СО РАН) за полезные критические замечания на стадии подготовки диссертации. Кроме того автор выражает благодарность к.б.н. Лашину С.А. (Лаборатория молекулярно-генетических систем, ИЦиГ СО РАН) и Алемасову Н.А. (Межинститутский сектор высокопроизводительных вычислений в биоинформатике, ИЦиГ СО РАН) за квалифицированную помощь и консультации при подготовке эксперимента по молекулярной динамике, а также при написании дополнительных программ на языке Java. Также автор выражает признательность Сибирскому Суперкомпьютерному Центру (ИВМиМГ СО РАН) и лично Кучину Н.В. за техническую поддержку в проведении экспериментов.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Живые системы в условиях высоких давлений

Давление является важным фактором внешней среды для живых организмов. У земной поверхности величины давлений могут меняться от  $\sim 0,03$  кПа на высоте Эвереста и в верхних слоях тропосферы до 1000 МПа в литосфере ( $1 \text{ Па} \approx 10^{-5} \text{ атм}$ ,  $1 \text{ МПа} \approx 10 \text{ бар}$ ). Большинство известных нам видов существуют при атмосферном давлении (0.1 МПа), однако некоторые из них могут выживать и в верхних слоях атмосферы, и на океанской глубине около 11 километров у дна Марианской впадины при давлениях 100 МПа (Рисунок 1). Организмы, которые могут временно выдерживать высокие давления (до 40 МПа), называют пьезотолерантными. Организмы, для которых высокое давление (20 МПа и выше) является облигатным фактором существования, называются пьезофилами (от греческого  $\pi\acute{\epsilon}\zeta\omega$  – сдавливать и  $\phi\acute{\iota}\lambda\acute{\iota}\alpha$  – любовь). Отметим, что эти термины начали использоваться сравнительно недавно, заменив менее подходящие «баротолерантный» и «барофильный» (от греческого  $\beta\acute{\alpha}\rho\omicron\varsigma$  – тяжесть,  $\phi\acute{\iota}\lambda\acute{\iota}\alpha$  – любовь), которые сейчас практически не употребляются.

Наиболее активно в настоящее время изучаются микроорганизмы – пьезофилы, которые обитают в океанах на больших глубинах. Океаны составляют более чем 70% земной поверхности. Большая их часть приходится на глубины более чем 2000 метров. Эта среда обитания характеризуется низкой температурой, высоким гидростатическим давлением и недостатком солнечной радиации (Bartlett, 1991). Несмотря на столь экстремальные условия, в глубинных водах наблюдается большое разнообразие организмов. Здесь превалирует хемоавтотрофный метаболизм (Bull *et al.*, 2000).

Считается, что вне глубоководных экосистем жизнь микроорганизмов в основном гетеротрофная, и она поддерживается только лишь питательными

веществами, которые случайным образом поступают из вышележащих слоёв воды (Witte *et al.*, 2003). Однако, последние исследования об уникальной природе глубоководного углерода (Aluwihare *et al.*, 2002) и азота (Aluwihare *et al.*, 2005) вместе с тем фактом, что основные группы архей могут быть хемоавтотрофами, могут изменить эту точку зрения.

Один из наиболее важных параметров окружающей среды в глубоководной зоне – гидростатическое давление, которое обеспечивает вертикальную зональность распространения микроорганизмов за счет адаптации филогенетических групп к этому физическому параметру. Пьезофильные микроорганизмы имеют достаточно широкий разброс оптимальных для своего роста давлений. Большинство из этих микроорганизмов принадлежат к родам *Colwellia*, *Moritella*, *Photobacterium*, *Pyschromonas*, *Shewanella* (DeLong *et al.*, 1997), также к бактериям, перерабатывающим сульфат *Desulfovibrio* (Alazard *et al.*, 2003) и один грамм-положительный представитель рода *Carnobacterium* (Lauro *et al.*, 2006). Считается, что эти микроорганизмы являются только небольшой частью филогенетического и физиологического разнообразия глубоководной экосистемы. Вероятно, что все эти обитатели холодных глубоких океанов, формирующие отдельные таксоны внутри типа микробов, имеют общего предка, и те адаптации к пониженной температуре могут являться предпосылкой к началу формирования приспособленности к глубоководным условиям (Lauro *et al.*, 2007).

Другим типом глубоководных сообществ являются сообщества гидротермальных источников, т.н. черных и белых курильщиков. Исследования этих экосистем изменили представление о жизни и её разнообразии. В них обитают организмы, называемые «гипертермофилами», для которых оптимальная температура существования может превышать 80°C (Reysenbach *et al.*, 2002). Во многих экосистемах, служащих местообитанием этим микроорганизмам, наблюдается нехватка или полное отсутствие солнечной радиации, что вынуждает искать альтернативные

источники жизненной энергии, в частности энергии окислительно-восстановительных реакций геохимических источников. К таким реакциям относятся, например, реакции образования метана, используемые археями, и восстановления серы, широко распространённые среди бактерий, обитающих вокруг подводных «курильщиков» (Reysenbach *et al.*, 2002). За последние два десятилетия наблюдается огромный рост числа открытых термофильных штаммов (Zhang *et al.*, 2002), которые используют различные пути преобразования геохимической энергии глубоководных вулканов и наземных термальных источников в своем метаболизме. Например, микроаэрофилы, аэробные и анаэробные организмы; гетеротрофы, которые используют органический углерод в качестве единственного источника энергии или иногда совмещённый с восстановлением железа как у *Geoglobus ahangari* (Tor *et al.*, 2001); и хемолитоавтотрофы, которые используют неорганические вещества, фиксируя углекислый газ, как археи *Methanocaldococcus jannaschii* (Jones *et al.*, 1983). Существование микроорганизмов, получающих энергию из геотермальных источников, разрушило мнение о том, что солнце это единственный источник жизненной энергии на нашей планете. Отметим, что организмы, обитающие в гидротермах на глубинах океана от 2 до 4 км, также являются и пьезофилами.

Исследования, проводимые (Jannasch *et al.*, 1984) продемонстрировали, что существуют микроорганизмы, которые могут расти и размножаться и при давлении превышающим 100 МПа. Например, они обнаружили пьезотолерантных микробов, у которых снижается скорость метаболизма, но они способны существовать при высоком давлении, а также пьезофильных организмов, у которых скорость роста и метаболизма повышаются при высоком давлении. Похожая работа (Baross *et al.*, 1993) показала, что некоторые штаммы гидротермальных микробов пьезотолерантны при пониженной температуре, но оказываются пьезофильны и размножаются со значительно большей скоростью при повышенной, а также, что некоторые микробы процветают при температуре более 100°C.

В последние годы достижения в исследовании биоразнообразия, развитии генных технологий и биотехнологий вторичных метаболитов оживили интерес к этой области микробиологии. Лабораторные исследования культур микробов под высоким давлением укрепили мнение, что жизнь совместима с экстремальными условиями (Simonato *et al.*, 2006).

Таким образом, последние исследования показали, что на нашей планете существуют экосистемы, способные существовать в экстремальных условиях местообитаний, параметры окружающей среды в которых могут отличаться от условий, оптимальных для человека, кардинальным образом. Результаты позволили установить, что наши представления о границах условий существования жизни становятся всё более широкими.

## **1.2. Влияние высокого давления на функции живых систем**

### **1.2.1. Влияние высокого давления на физиологические процессы микроорганизмов**

Как было сказано выше, давление является повреждающим фактором для живых клеток. Для ответа на вопрос о том, каковы механизмы воздействия высоких давлений на клетку, необходимо исследовать клеточные биохимические и молекулярные процессы, которые подвергаются дисфункции при воздействии высоких давлений.

Исследования транскриптома и протеома показали, что повреждающий эффект воздействия гидростатического давления зависит от его величины. Высокое давление ингибирует биосинтез рибосомных белков и белков, транслируемых с генов теплового шока у *Lactobacillus sanfranciscensis* (Normann *et al.*, 2006) и *E.coli* (Ishii *et al.*, 2005). Это объясняется диссоциацией рибосомальных субъединиц, которое было обнаружено как *in vitro* (Gross *et al.*, 1990; Gross *et al.*, 1993), так и *in vivo* (Alpas *et al.*, 2003). Таким образом, одним из основных клеточных процессов, который

нарушается при повышенном гидростатическом давлении, является биосинтез белка.

Интересное поведение в экстремальных условиях демонстрируют бактерии рода *Psychromonas*. После помещения их в среду с пониженным содержанием питательных веществ и при повышенном давлении, клетки снижают свою биомассу, содержание в мембране ненасыщенных жирных кислот и увеличивают свою способность прикрепляться к стеклянному субстрату (Rice *et al.*, 1992). Последнее неожиданное свойство авторы исследования объяснили не как физиологическое приспособление микроорганизмов к высокому давлению, а как их адаптацию к условиям, обедненным питательными веществами на больших глубинах: известно, что на больших глубинах количество органических веществ на поверхностях океанического дна выше, чем в водной толще (Rice *et al.*, 1992).

Другое свойство, отличающее глубоководных микроорганизмов от мелководных, это более высокая развитость системы хемотаксиса. Причиной таких различий, как и в случае с повышенной адгезией, вероятнее всего, является необходимость более интенсивного поиска питательных веществ на больших глубинах (Grossart *et al.*, 2001). В глубоководных экосистемах активное потребление нерастворимых органических веществ может обеспечиваться большим количеством метилакцептирующего белка хемотаксиса представленного в генотипах всех глубоководных видах (Blackburn *et al.*, 1998). Эти белки преобразуют сигналы, которые реагируют на градиент концентрации химических веществ в окружающей среде, транслируя сигнал о направлении движения жгутиковому аппарату. Эти сенсорные системы способны зафиксировать микроскопическое изменение концентраций субстрата в окружающей среде, для того чтобы дать возможность клеткам максимизировать их продуктивность и рост в окружающей среде с небольшим количеством пищевых ресурсов (Wirsen *et al.*, 1999).

Кластеры генов, отвечающие за подвижность и хемотаксис, являются наиболее дивергентными среди таксонов микроорганизмов (Campanago *et al.*, 2005). Фактически, сравнение геномов, основанное на анализе микрочипов между тремя штаммами *P. profundum* показало, что глубоководные виды имеют дополнительный кластер генов, которого нет у мелководных видов. Функция этого дополнительного кластера неизвестна, но предварительные результаты показали, что глубоководные штаммы имеют повышенную подвижность при высоком давлении и пониженную при атмосферном, в то время как представители мелководных видов наоборот (Eloe *et al.*, 2008).

Жгутиковый аппарат и его функции также недостаточно изучены в рамках модели приспособленности к жизни при высоких давлениях. Однако исследования показывают, что подвижность это, возможно, самый чувствительный к давлению клеточный процесс у океанических прокариот (Bartlett, 2002).

Мембраны клеток также подвержены значительному влиянию повышенного давления. Так в работе Перриер-Корнета и соавт. (Perrier-Cornet *et al.*, 1999) исследовалось влияние высокого давления (250 МПа) на клетки дрожжей. Выяснилось, что при таком давлении у данных организмов нарушается транспорт через мембрану клетки важнейших ионов, как  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . Таким образом, мембрана перестала выполнять одну из своих важнейших функций. В исследовании Хонга и соавт. (Hong *et al.*, 2000) проводился эксперимент с клетками бактерий *Lactobacillus plantarum*, которые подвергались воздействию давления 7МПа при температуре 30°C. В таких условиях наблюдалось необратимое разрушение клеточной мембраны.

Но как долго пьезофилы могут выживать в среде с недостаточным питанием или совсем без него? В одном длительном эксперименте с представителями бактерии рода *Psychromonas* в культуре бактерий поддерживалось высокое давление в течение 20 лет (DeLong *et al.*, 1986). После декомпрессии и перенесения бактерий на новый субстрат, наблюдался их экспоненциальный рост в продолжение двух недель.

### **1.2.2. Влияние высокого давления на метаболизм белков**

Ещё одно интересное исследование провели Хазен и соавт. (Hazen *et al.*, 2002), в котором они изучали влияние водного раствора при суперкритических условиях на биосинтез и стабильность важных биомолекул. Суперкритические условия подразумевают давление 50-500 МПа и температуру 150-300°C (Brandes *et al.*, 1998). При такой температуре диэлектрическая константа воды значительно снижается, в то время как содержание ионных продуктов увеличивается. Эти физические изменения сильно влияют на химические свойства воды. Действительно, повышенная температура приближает воду как растворитель к полярным органическим растворителям. В своих экспериментах они обнаружили, что давление сильно способствует формированию циклических компонентов внутри молекул формирующих биологические мембраны, а также увеличивает температурную стабильность жидкой фазы. Миллер и соавт. (Miller *et al.*, 1995) показали, что давление способствует протеканию некоторых биохимических реакций, в частности разложения органических соединений. Исследуя влияние экстремальных условий на аминокислоты, они обнаружили, что при температурах больше 150°C эти соединения быстро разлагаются. Например время полураспада лейцина при 200°C и 50 МПа было меньше 10 минут. Однако в присутствии FeS оно увеличивалось до 30 часов.

### **1.2.3. Влияние высокого давления на мембранные белки**

Говоря о влиянии давления на белки, стоит упомянуть мембранные белки, которые пока менее изучены, чем глобулярные, так как их очень сложно получить в кристаллическом виде. Особая роль мембранных белков (а они составляют до половины веса мембраны) – обеспечивать транспорт через неё различных веществ, а также сигналов. Таким образом, они играют роль проводников, причём каждый из них очень специфичен и пропускает

через мембрану только определённые молекулы. Например, водные каналы, которые пропускают воду через мембрану и играют очень важную роль в осмотической регуляции клетки. Аквапорины – это семейство белков, образующих водные каналы, представленные во всех жизненных формах. Большое разнообразие аквапоринов было обнаружено у растений, которые очень зависимы от воды и используют осмотическое давление для осуществления многих своих физиологических процессов. Аквапорины также широко распространены во многих человеческих органах, например, в почках, глазах, головном мозге и их дисфункция может вызывать диабет и катаракту. Некоторые из этих белков были обнаружены в бактериях.

Способность клеточной мембраны пропускать воду характеризуется разницей гидростатического или осмотического давлений снаружи и внутри клетки. В работе (Zhu *et al.*, 2002) проводилось исследование изменения свойств мембранных белков под влиянием высокого давления с помощью моделирования методом управляемой молекулярной динамики (SMD). Результаты этой работы показали, что при давлении порядка 400 МПа поверхность липидного бинарного слоя становилась менее регулярной и более плоской, чем при равновесных условиях. Подобные изменения не наблюдаются при более низком давлении, скажем 200 МПа. Общие структуры белков оставались стабильными во всех моделированиях. Однако моделирование при 400 МПа показало, что в некоторых мономерах несколько молекул воды проникло во внутреннюю полость белка. Такое поведение находится в согласии с предполагаемым механизмом денатурации белка вызванной высоким давлением (Hummer *et al.*, 1998). Таким образом, при повышении давления со стороны периплазмы до 400 МПа, молекулы воды проникали в пространство между боковой группой и основной цепью одного из мономеров аквапорина и нарушали водородные связи между аргинином-206 и гуаниновой группой. Не будучи стабилизирован водородными связями, аргинин смещался со своей обычной позиции и перекрывал канал аквапорина.

**Таблица 1.** Эффекты, вызываемые повышением давления на различные биологические структуры (Daniel *et al.*, 2006).

Компонент клетки	Эффекты давления	Приспособление или нарушение работы
Нуклеиновые кислоты	Стабилизация водородных связей ДНК (Chong <i>et al.</i> , 2005); Увеличение температуры перехода от одноцепочечной к двуцепочечной форме (Dubins <i>et al.</i> , 2001)	Нарушение работы механизмов репликации, репарации, рекомбинации и транскрипции
Липидные мембраны	Образование дополнительной гелевой фазы, которая не наблюдается при нормальных условиях (Valny <i>et al.</i> , 2001)	Регулирование фракций липидных компонентов в клеточной мембране, которые отличаются по длине цепи, по насыщенности цепи или по основной группе структуры
	Ослабление белково-липидных взаимодействий, агрегации белка; осложнение транспорта электронов и взаимодействий гормон-рецептор (Winter, 2005)	Нарушение работы мембранных транспортных систем и энергетического метаболизма
Белки	Разворачивание белковой структуры в результате попадания молекул воды в гидрофобную часть белка (белки в 5–10 раз менее сжимаемы чем вода); ослабление агрегации белка; диссоциация рибосом (Winter, 2005)	Нарушение работы системы биосинтеза белков; ослабление ферментативных реакций
	Усиление чувствительности к присутствию реагентов вызывающих диссоциацию (такие как мочевина) (Smeller <i>et al.</i> , 2006)	Добавление стабилизаторов белка – солей и осмолитов (полиолов глицерола, сорбитола и сахарозы)

В таблице 1 приведён список эффектов, вызываемых повышенным давлением у различных компонентов клеток. Из этой таблицы видно, что для организмов, обитающих в условиях атмосферного давления, высокое давление является повреждающим фактором, который приводит к

дисфункции целого ряда молекулярных систем клеток, в первую очередь, биосинтеза белка. Устойчивость пьезотолерантных микроорганизмов и пьезофилов может свидетельствовать о том, что эти молекулярные системы адаптированы к функционированию в экстремальных условиях. Поэтому изучение молекулярных механизмов этих нарушений, а так же механизмов устойчивости этих молекулярных систем к повышенным давлениям у организмов-пьезофилов представляет большой интерес. Отметим, что в большинстве случаев эти эффекты связаны с нарушением структуры или функции белков, участвующих в этих процессах. Таким образом, одним из важных направлений биологии высоких давлений является изучение влияния этого фактора на структуру и функцию белковых макромолекул.

### **1.3. Влияние высокой температуры на функции живых систем**

#### **1.3.1. Гипертермофильные микроорганизмы – основа биотехнологий.**

Считается, что физиологическими пределами существования живых организмов является температура от  $-40^{\circ}\text{C}$  до  $+115^{\circ}\text{C}$  (в стратосфере и гидротермальных источниках соответственно) (Jaenicke *et al.*, 1998). Говоря о жизни при высоких температурах необходимо отметить, что существование микроорганизмов в гидротермальных источниках, таких как, например, в Йеллустонском национальном парке в США, изучается с 60х годов двадцатого века (Brock, 1967). Однако, открытие микробной жизни в глубоководных термальных источниках и вулканических регионах по всему миру в конце 70х начале 80х годов двадцатого века (Jones *et al.*, 1983) привело к пониманию, что так называемые гипертермофилы (оптимальная температура роста более  $70^{\circ}\text{C}$ ) географически, физиологически и филогенетически наиболее разнообразны, чем представлялось ранее. Множество новых родов и видов, как бактерий, так и архей, были описаны, включая несколько видов, которые стали «модельными» микроорганизмами благодаря их интересным метаболическим свойствам и относительной

простотой культивирования в лабораторных условиях (Frock *et al.*, 2012). Три археи: *Pyrococcus furiosus* (Fiala *et al.*, 1986), морской факультативный анаэроб (оптимальная температура 98-100°C), *Thermococcus kodakarensis* (оптимальная температура 85°C), также морской факультативный анаэроб (Fukui *et al.*, 2005), и *Sulfolobus solfataricus*, наземный гетеротрофный ацидофильный аэроб (оптимальная температура 80°C, pH=3,5) (She *et al.*, 2001), и *Thermotoga maritima*, морская факультативная анаэробная бактерия (оптимальная температура 80°C) (Connors *et al.*, 2006), стали основой большинства фундаментальных и биотехнологических исследований, направленных на изучение жизни при высоких температурах. Фактически большая часть того, что известно сегодня о физиологии и энзимологии гипертермофилов основано на изучении этих «модельных» микроорганизмов.

Трудности в выделении гипертермофилов из-за суровой и часто недоступной среды их обитания, и в дальнейшем в культивировании этих организмов в лабораторных условиях, изначально представляют серьезные проблемы для их изучения и, как следствие, для применения в биотехнологии. Однако в начале 90х годов двадцатого века были предприняты успешные попытки клонирования и экспрессии генов гипертермофилов в мезофильных рекомбинантных хозяевах, таких как *Escherichia coli* (Fabry *et al.*, 1988). Более того, с 1995 года, когда был секвенирован геном гипертермофила *Methanococcus jannaschii* (Bult *et al.*, 1996), усилия направленные на изучение высокотемпературных организмов позволили реализовать проекты не только по выявлению перспективных биокатализаторов, но и выявить метаболические пути и клеточные функции, которые имеют прямое отношение к биотехнологиям.

Самые ранние исследования воздействия температуры на белки были связаны с изучением ее влияния на каталитическую активность, изменение активности ферментов для компенсации температурных изменений, а также на межвидовые различия в термостабильности белков (Cossins *et al.*, 1987;

Hazel *et al.*, 1974). Последние работы всё больше обращают своё внимание на две вещи: (а) адаптивные изменения в структурных и кинетических свойствах среди гомологов белков, различия в которых могут иметь решающее значение в поддержании термального оптимума организма и (б) влияние температуры на экспрессию белков (Somero, 1995).

### **1.3.2. Молекулярные адаптации и влияние температуры на метаболизм белков.**

Большинство культивированных в настоящее время гипертермофилов является хемолитоавтотрофами. Эти организмы могут снабжать свои клетки углеродом, получая его из углекислого газа, и могут получать энергию от окисления серы, сульфидов, водорода. Некоторые хемолитотрофы, например, некоторые виды родов *Thermoproteus*, *Pyrobaculum* и *Pyrodictium* являются факультативными гетеротрофами и могут использовать органические питательные вещества. Другие виды являются облигатными гетеротрофами, которые получают энергию через дыхание или ферментативный тип метаболизма (Stetter, 1996, 1999).

Молекулярные механизмы, позволяющие организмам справиться с экстремально высокими температурами различны, включая специфические адаптации на различных уровнях (а) структуры и функций макромолекул, (б) физиологии и метаболизма и (с) регуляции экспрессии генов и поддержания целостности ДНК (Sterner *et al.*, 2001). По крайней мере, три пункта заслуживают внимания в этом контексте, а именно функционирование мембраны, ДНК и стабильность и функционирование белка при экстремальных температурах. Относительно клеточных мембран, было предположено, что тетраэфирные липиды монослоя мембраны, обнаруженные в гипертермофильных археях, лучше приспособлены для жизни при высоких температурах, чем бактериальные мембраны в виде бислоя, состоящего из липидов сложноэфирного типа. Эфирные связи

являются более устойчивыми к температуре, чем связи сложного эфира, мембраны из тетраэфирных липидов показывают чрезвычайно низкую проводимость протонов и ионов (van de Vossenberg *et al.*, 1998).

При экстремальных значениях температуры, давления и pH белки могут быть подвержены необратимому гидролизу,  $\beta$ -элиминированию, окислению или изменению в структуре пар дисульфидных мостиков (Daniel *et al.*, 1996). В результате при значениях температуры выше точки кипения воды, время существования некоторых аминокислот становится значительно короче, чем время жизни организма у гипертермофилов (Jaenicke *et al.*, 1998). Кроме того, гидролиз пептидных связей устанавливает теоретические пределы стабильности белка, непосредственно влияя на целостность полипептидной цепи на её базовом уровне – на уровне последовательности аминокислотных остатков. Однако, многие ферменты гипертермофилов стабильны и активны при температурах значительно превышающих нормальные условия.

### **1.3.3. Термостабильность белков.**

Почему же белки мезофильных организмов так чувствительны к температуре? Основной ответ заключается в том, что, несмотря на возникновение сотен нековалентных связей (водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия) между аминокислотными остатками внутри белка, и между белком и растворителем, разница в свободной энергии между денатурированной полипептидной цепью и нативной структурой белка для большинства из них имеет порядок 8-17 ккал/моль, что соответствует нескольким нековалентным связям (Somero, 1995). Среди эффектов стабилизирующих структуру можно назвать расположение гидрофобных остатков во внутренней части белка (гидрофобный эффект), среди дестабилизирующих - снижение конфигурационной энтропии во время сворачивания белка (Privalov *et al.*, 1989). Этот баланс между стабильностью и лабильностью, который был

обнаружен практически во всех белках и во всех таксонах, является закономерным свойством в эволюции белков (Jaenicke, 1991).

Баланс между стабильностью и лабильностью белка принимает большее значение при рассмотрении того факта, что термостабильность ортологов почти всегда положительно коррелирует с температурой оптимальной для роста организма. Эти взаимоотношения были обнаружены во многих структурных белках, например, в кристаллине (McFall-Ngai *et al.*, 1990), актине (Swezey *et al.*, 1982) и многочисленных ферментах (Dahlhoff *et al.*, 1993). Таким образом, баланс между стабилизационными и дестабилизационными силами регулярно проявляется в процессе эволюции: при высоких температурах, также как и при физиологических температурах, гомологичные белки по-разному приспособленных видов имеют сходную структурную стабильность.

#### **1.3.4. Термодинамическая стабильность белков.**

Термодинамическая стабильность это разница свободных энергий между нативным ( $F$ ) и денатурированным ( $U$ ) состояниями белка, которая обозначается как  $\Delta G_{FU}$ .  $\Delta G_{FU}$  может быть определена если рассматривается модель с двумя состояниями:



где  $F$  это нативная структура белка,  $U$  – денатурированное состояние,  $k_u$  и  $k_f$  – константы скоростей денатурации и формирования нативной структуры, соответственно. Модель с двумя состояниями подразумевает, что переход из состояния  $F$  в  $U$  обратим, белок может находиться только в двух состояниях и переходных состояний не существует. Из уравнения константы равновесия  $K = \frac{k_u}{k_f} = \frac{[U]}{[F]}$ ,  $\Delta G_{FU}$  может быть рассчитана следующим образом:  $\Delta G_{FU} = -RT \ln K$  (Sternier *et al.*, 2001).

Значения  $\Delta G_{FU}$  для мезофильных белков часто находится между 30 и 60 кДж/моль, что эквивалентно нескольким водородным связям или гидрофобным взаимодействиям (Pfeil, 1998). При температуре 25°C значения  $\Delta G_{FU}$  термофильных белков незначительно выше, чем у мезофильных. Температура, при которой количество белка в состояниях  $F$  и  $U$  одинаково ( $K = 1$ ,  $\Delta G_{FU} = 0$ ) называется температурой плавления  $T_m$ , которая часто используется для характеристики термальной стабильности конкретного белка.

### **1.3.5. Кинетическая стабильность белков.**

Денатурация под воздействием температуры большинства мезофильных и термофильных белков необратима в основном из-за агрегации денатурированного состояния  $U$ , и таким образом, не может быть описана уравнениями термодинамики. Простая модель необратимой денатурации выглядит следующим образом:



где  $X$  – это необратимо денатурированное состояние и  $k_i$  – константа скорости перехода от  $U$  к  $X$ . В случае необратимой денатурации, константа всего процесса – перехода из состояния  $F$  в  $X$ , определяется как  $k_{obs} = \frac{(k_u \times k_i)}{(k_f + k_i)}$ .  $k_{obs}$  при данной температуре часто используется как мера стабильности. Иногда также используется температура, при которой в растворе денатурировало ровно половина молекул белка. Такая температура называется температурой полу-инактивации. Согласно модели необратимой денатурации, верхний предел константы  $k_{obs}$  определяет  $k_u$ , так как только состояние  $U$  (а не  $F$ ) переходит в необратимое состояние. Это может иметь особую значимость для термофильных белков (Plaza del Pino *et al.*, 2000). При высоких физиологических температурах необратимые процессы в

термофилах, такие как агрегация или ковалентное изменение термально лабильных аминокислотных остатков, будут происходить быстрее и поэтому  $k_i \gg k_f$  и  $k_{obs} \sim k_u$ . По этой причине низкое значение  $k_u$  важно для кинетической защиты белков термофильных организмов, особенно *in vivo*. Экспериментальные данные подтверждают эту гипотезу: в некоторых случаях значение  $k_u$  измеренное для термофильных белков больше, чем для гомологичных мезофильных белков (Sternier *et al.*, 2001).

### **1.3.6. Сравнение стабильности мезофильных и термофильных белков.**

В настоящее время известно только ограниченное число белков термофильных организмов, которые подвержены полностью обратимой денатурации и для которых  $\Delta G_{FU}(T)$  может быть определена как функция от температуры. Большинство из этих белков малы, представляют собой мономеры и состоят из одного структурного домена. Увеличение термостабильности данных белков может происходить из-за низкой степени денатурации.

Например, белок Sso7d из *Sulfolobus solfataricus* и белок Sac7d из *Sulfolobus acidocaldarius*. Эти белки являются ДНК-связывающими и содержат порядка 65 аминокислотных остатков. Значение их температуры плавления  $T_m$  находится на уровне 98 и 91°C соответственно (Knapp *et al.*, 1996; McCrary *et al.*, 1996). Оба белка подвержены обратимой денатурации. Значения  $\Delta G_{FU}(T)$  для этих белков невелики, и высокие значения  $T_m$  достигаются из-за низких значений  $\Delta C_p$ , которые, однако, соответствуют значениям мезофильных белков сравнимого размера. При физиологических температурах оба белка только незначительно устойчивы со значениями  $\Delta G_{FU}$  от 4 до 8 кДж/моль (Sternier *et al.*, 2001).

#### 1.4. Влияние повышенных давлений на структуру и функцию белков

Гидростатическое давление является модулятором многих биохимических процессов: оно тормозит бактериальный рост (Sharma *et al.*, 2002), влияет на жизнеспособность вирусных частиц (Ferreira *et al.*, 2009), изменяет структуру белка и активирует/инактивирует ферментативные реакции. Давление выше 300-400 МПа вызывает денатурацию белка (Weber, 1992), а при значениях 100-200 МПа происходит диссоциация на олигомеры (Weber, 1987). Недавно стало ясно, что наряду с другими параметрами, такими как температура, состав растворителя, давление может использоваться для более подробного термодинамического и кинетического описания биопроцессов и биосистем и для регуляции их поведения. В настоящее время большинство биофизических методов приспособлено для работы с высокими давлениями, чтобы способствовать развитию фундаментальных и прикладных исследований с реальным применением в промышленности, медицине и фармацевтике (Brown *et al.*, 2003; Balny, 2006).

Принцип Ле Шателье постулирует, что система в равновесии имеет тенденцию к минимизации эффекта внешних возмущений. Следовательно, в химической реакции увеличение давления сдвигает равновесие в пользу реагентов, которые занимают меньший объём. Связь между давлением  $P$  и константой равновесия  $K$  может быть выражена следующим образом:

$$K(p) = K(0)\exp(-p\Delta V/RT), \quad (3)$$

где  $K(p)$  и  $K(0)$  – константы равновесия, управляющие процессом при давлении  $P$  и атмосферном соответственно,  $T$  – температура, и  $R$  – универсальная газовая постоянная (Cioni *et al.*, 2011). Поэтому изменение объема компонентов  $\Delta V$  в результате изменения давления помогают оценить фундаментальные характеристики процесса. В отношении белков давление деформирует их структуру непрерывным образом, изменяя только межмолекулярные расстояния (Weber *et al.*, 1983), в отличие от других

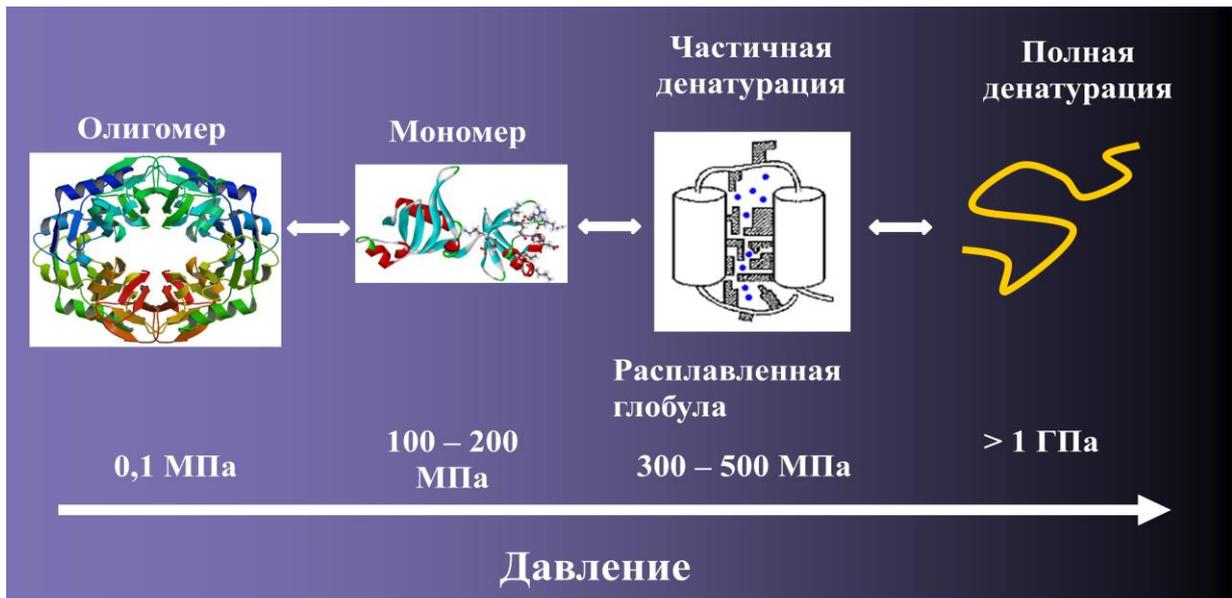
дестабилизирующих факторов, таких как температура или добавление денатурирующих агентов, которые имеют комплексное влияние на систему.

Высокое давление широко используется для изучения стабильности белков (Davidovic *et al.*, 2008), процесса укладки (Silva *et al.*, 1993), и процессов агрегации и диссоциации белков (Seefeldt *et al.*, 2009). Более того, так как сжимаемость белка непосредственно связана со структурными и конформационными флуктуациями, изучение молекулярных механизмов, которые составляют эффект влияния высокого давления на структуру биологических макромолекул, помогают понять динамическое поведение белков при атмосферном давлении. Фактически в течение прошлых лет использование влияния высокого давления для изучения динамики белков, пополнилось такими методами как триптофановая флюоресценция (Weber *et al.*, 1983), фосфоресценция (Cioni *et al.*, 1999), инфракрасная спектроскопия (Dzwolak *et al.*, 2002), ЯМР спектроскопия (Jonas *et al.*, 1994) и рентгеноструктурная кристаллография (Collins *et al.*, 2007).

Многочисленные компьютерные исследования, проведенные в последнее время, также позволили выявить ряд аспектов влияния повышенного давления на структуру и функцию белка. Эти исследования подтвердили, что глобулярные белки имеют тенденцию к денатурации при давлениях близких к 300 МПа. Этот процесс обусловлен уменьшением объёма, которое также может происходить при размыкании внутримолекулярных полостей или при сжатии растворителя возле заново обнажившейся поверхности белка. Достер и соавторы (Doster *et al.*, 2003) исследовали влияние повышенного давления на процесс денатурации миоглобина с помощью методов молекулярной динамики. Учёные обнаружили, что миоглобин денатурировал при pH 7 в диапазоне давлений от 300 МПа до 450 МПа. Это позволило предположить, что скачкообразное увеличение эластичности белка при более чем 300 МПа отражает процесс денатурации молекулы, вызванный давлением. Увеличение разброса эластичности может возникать из-за снижения структурных флуктуаций

развёрнутой формы молекулы или из-за геометрических ограничений. Исследователи предположили, что основным эффектом влияния давления является уменьшение амплитуды молекулярных колебаний. Также было обнаружено, что в результате этого процесса изменяется вязкость белковой глобулы.

Паник и соавт. (Panick *et al.*, 1998) проводили компьютерное моделирование денатурации нуклеазы стафилококка дикого типа, вызванной давлением. Результаты эксперимента показали, что повышение давления до 300 МПа приводит к увеличению радиуса гирации белковой молекулы приблизительно в два раза и к большому увеличению расстояний между боковыми группами аминокислот, которое соответствует переходу из состояния глобулы в состояние клубка. Спектральный анализ показал, что процесс денатурации начинается при 25°C и 150 МПа и сопровождается увеличением содержания неструктурированных элементов белка, в то время как содержание  $\alpha$ -цепей и  $\beta$ -складок снижается. Однако и в почти денатурированном состоянии при давлении больше 300 МПа сохраняются элементы, подобные,  $\beta$ -складкам, и, поэтому, молекула не может считаться абсолютно неструктурированной. Денатурация, вызванная температурой, наоборот способствует дальнейшему разворачиванию белковой молекулы и к полному разрушению вторичной структуры. Кроме того, было показано, что при скачке давления от 0,1 МПа до 240 МПа радиус гирации увеличивался с 17Å до 22,4Å. Это увеличение может быть вызвано образованием состояния клубка.



**Рисунок 1.** Влияние давления на структуру белков и их комплексов по Даниэль и соавт. (Daniel *et al.*, 2006).

В работе Абе и соавторов (Abe *et al.*, 2006) проводилось экспериментальное исследование влияния высокого давления на активность полигалактуроназ глубоководных дрожжей *Cryptococcus liquefaciens*. Это ферменты, относящиеся к классу пектиназ, которые осуществляют гидролитическое расщепление гликозидных связей пектинов и широко используются в пищевой промышленности. Исследования показали, что при температуре 24°C активность полигалактуроназ глубоководных дрожжей с увеличением давления практически не изменяется, а при 10°C незначительно снижается. Это свидетельствует о том, что комплекс, образуемый полигалактуроназами глубоководных организмов с полигалактуроновой кислотой, хорошо сжимается, может становиться более компактным и это практически не отражается на активности фермента.

В работе (Kawano *et al.*, 2005) было исследовано влияние высокого давления на комплекс белок-ДНК бактерии *Shewanella violacea* (штамм DSS12). Анализировался регуляторный фактор транскрипции прокариот NtrC, который формирует комплекс с РНК-полимеразой и активирует транскрипцию гена *glnA*. Известно, что бактерии данного штамма имеют оперон, регулируемый давлением. При повышении давления происходит

активация промотора (Ikegami *et al.*, 2000). Результаты исследования показали, что комплекс NtrC-ДНК в диапазоне давлений 0,1 МПа – 50 МПа остаётся стабильным и не теряет своих функций. Увеличение давления до 70 МПа ведёт к диссоциации данного комплекса. Таким образом, давление 50 МПа является достаточным для того, чтобы активировать транскрипцию гена *glnA* и максимально возможным для работы комплекса NtrC-ДНК.

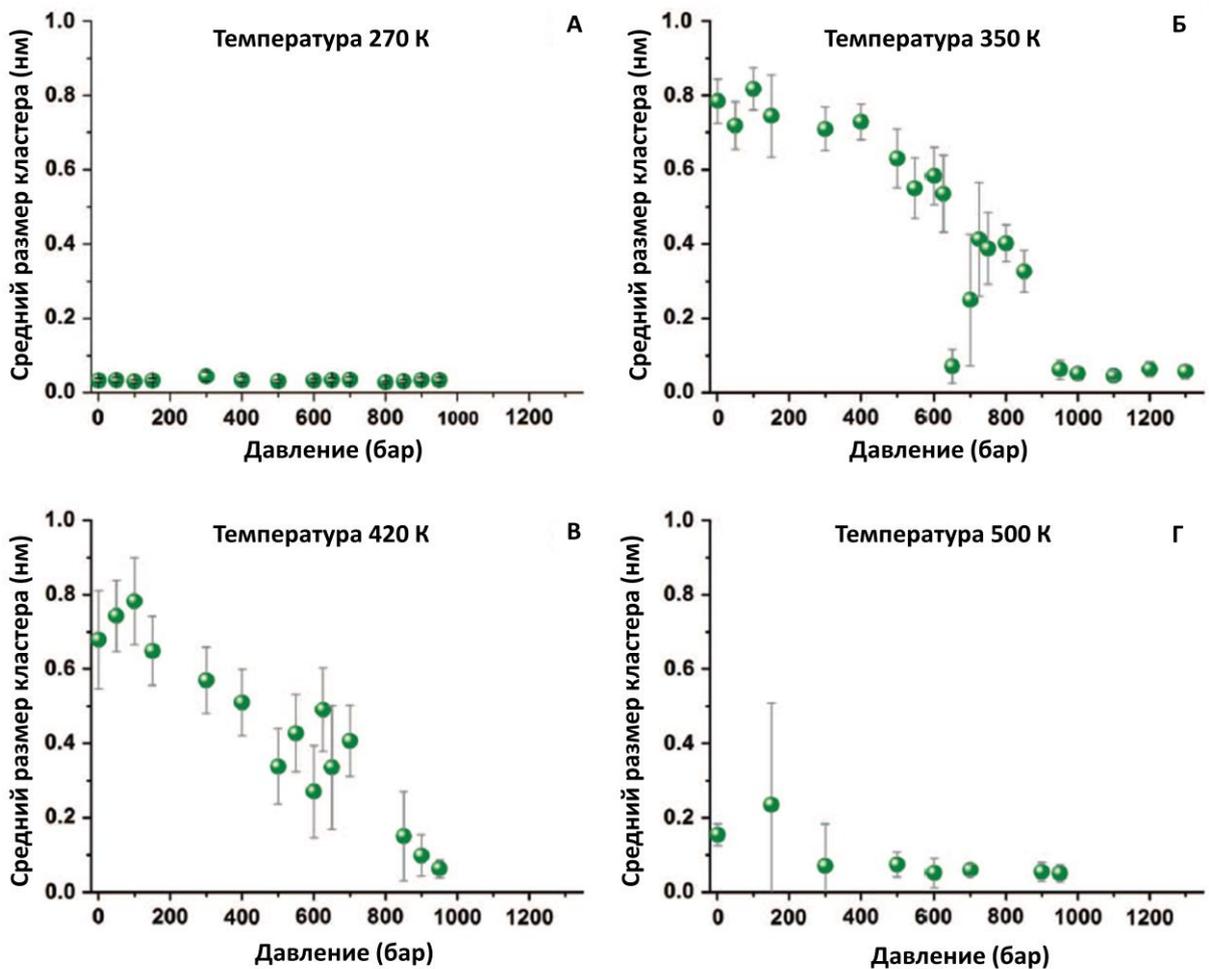
Денатурация белка под воздействием давления может происходить в результате попадания молекул воды в гидрофобное ядро. Наблюдение о том, что давление подвергает денатурации большинство белков, находится в разночтении с предсказанием гидрофобного эффекта, который предполагает, что попадание в воду гидрокарбонатов будет препятствовать этому процессу (Ogunmola *et al.*, 1977). Было предсказано (Collins *et al.*, 2005), что состояние, в которое попадает белок после денатурации вызванной давлением, больше соответствует интенсивной гидратации внутренней части белка, чем перемещение скрытых гидрофобных остатков в воду. Экспериментальные данные по заполнению полости вызванным давлением подтверждают эту гипотезу, демонстрируя практически нулевой штраф свободной энергии заполнения данной полости при низких давлениях. Повышенное давление настолько способствует наполнению этой полости, что даже образуются несколько новых, что вызывает частичную денатурацию белка (Collins *et al.*, 2005).

Вообще гидратация, вызванная повышенным давлением, может помочь объяснить, почему многие белки настолько сильно изменяют свою активность в этих условиях (Mozhaev *et al.*, 1996). Взаимодействия между водой и гидрофобной поверхностью белка являются чрезвычайно важными для изучения молекулярных взаимодействий при связывании лиганда или субстрата, а также белок-белковых взаимодействий (Harries *et al.*, 2005). Изменения в гидратации внутренней части белка могут повлиять, например, на функции ферментов. Слабо экранированные электростатические

взаимодействия во внутренней части белка обуславливают прочные связи между заряженными участками и молекулами воды.

Следует отметить, что, несмотря на интенсивные исследования влияния высоких давлений на стабильность и активность белка, до сих пор многие детали этих воздействий остаются неясными (Bowman *et al.*, 2011). Относительно узкий интервал значений температуры и давления, в котором белки поддерживают свою нативную структуру, делает этот механизм более интригующим. Независимо от механизма, известно, что гидрофобные взаимодействия важны для стабильности белковых структур, хотя точная роль этих взаимодействий всё ещё вызывает разногласия. Гидрофобные взаимодействия отличаются от других взаимодействий своей температурной зависимостью. В то время как сила других взаимодействий уменьшается при увеличении температуры, сила гидрофобных взаимодействий наоборот увеличивается (Franks *et al.*, 1973). Давление же наоборот уменьшает их силу (Caffarena *et al.*, 2004). Учитывая, что гидрофобные взаимодействия играют важную роль в упаковке белка, можно предположить, что ослабление этих взаимодействий может быть основной причиной денатурации под воздействием высокого давления. В своей работе Ferrara с соавторами (Ferrara *et al.*, 2012) изучали формирование гидрофобных кластеров из неполярных сферических частиц, взаимодействующих согласно потенциалу Леннарда-Джонса в воде. Исследование проводилось методом молекулярной динамики. Результаты показали, что давление практически не влияет на агрегацию гидрофобных частиц при температуре равной или ниже 270 К. То есть система Леннард-Джонсоновских частиц при таких температурах остаётся хорошо растворимой независимо от давления. При более высоких температурах наблюдается формирование кластеров частиц при нормальном давлении (0,1 МПа), которые диссоциируют при увеличении давления. Повышение температуры приводит к увеличению среднего размера кластеров неполярных частиц при одинаковом давлении. Однако при температуре 500К гидрофобные частицы теряют способность к

формированию кластеров. Диссоциация кластеров при этой температуре происходит независимо от давления (Рис. 2). Таким образом, изменение давления практически не влияет на образование кластеров гидрофобных частиц в данной системе при температурах ниже 270К и выше 500К. При температурах в этих пределах, повышение давления приводит к диссоциации гидрофобных кластеров, а увеличение температуры до 350-420 К наоборот, к увеличению их размера. Таким образом, данная работа демонстрирует, что в отношении образования гидрофобных кластеров в интервале температур 300-400К давление и температура являются антагонистами. Повышенное давление приводит к разрушению гидрофобных кластеров, а повышенная температура к их стабилизации.



**Рисунок 2.** Влияние давления и температуры на агрегацию гидрофобных частиц по Ferrara и соавт. (Ferrara *et al.*, 2012).

Приведённые данные показывают, что высокое давление способно нарушить структуру белковой молекулы, причём как глобулярного белка, так и мембранного. Как известно, структура белка определяет его функции. Таким образом, нарушая структуру, высокое давление нарушает корректное функционирование белка, например, путём деформации структуры активного центра, что приводит к невозможности связывания с лигандом. Необходимо отметить, что одним из важных факторов влияния давления на стабильность белка является его взаимодействие с растворителем.

## **1.5. Изучение влияние высокой температуры и давления на структуры белков методами молекулярной динамики**

### **1.5.1. Теоретические основы молекулярной динамики**

В настоящее время методы молекулярной динамики (МД) широко используются для исследования структур и функций белков. Основная идея этих методов заключается в представлении молекулы биополимера как системы многих взаимодействующих частиц - атомов. При компьютерном моделировании методом молекулярной динамики свойства этой системы описывает Ньютоновская механика, то есть, фактически, биомолекула превращается в систему шариков (это атомы) и пружинок (это ковалентные связи).

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = F_i, i = 1 \dots N. \quad (4)$$

где  $N$  – количество взаимодействующих атомов,  $F$  – полная сила.

Сила равняется отрицательной производной от потенциальной энергии:

$$F_i = -\frac{\partial U}{\partial r_i} \quad (5)$$

Данное уравнение решается на небольших временных отрезках. Важно отметить, что потенциальная энергия также определяет свойства системы из  $N$  частиц -  $U = U(r_1, \dots, r_N)$  и может быть описана как поверхность в

пространке координат атомов белка (поверхность потенциальной энергии – ППЭ). Минимумы ППЭ – метастабильные конфигурации (конформации). Предполагается, что глобальный минимум соответствует наиболее стабильной (нативной) структуре. Конформационный анализ подразумевает изучение свойств ППЭ.

Этот метод имеет некоторые ограничения (McQuarrie *et al.*, 1976). Использование уравнения движения Ньютона подразумевает применение классической механики для описания движения атомов. Это корректно для большинства атомов при нормальной температуре, но существуют исключения. Атомы водорода очень легкие и их движения часто имеют квантовый характер. Например, протон может преодолевать барьер потенциальной энергии (туннельный эффект). Такой процесс не может быть корректно описан с помощью классической динамики. Жидкий гелий при низкой температуре – ещё один пример, где классическая механика бессильна. Очень важную роль в описании играют колебания ковалентных связей. Статистическая механика классического гармонического осциллятора заметно отличается от реального квантового осциллятора. Соответственно для того, чтобы максимально приблизить молекулярную динамику к реальным условиям используют некоторые приближения. Например, мы можем рассматривать связи и углы между связями как ограничения в уравнениях движения. Важная практическая причина этого выбора заключается в том, что алгоритм может использовать большие промежутки времени. На практике временной шаг может быть в четыре раза больше, когда на связи наложены ограничения, чем когда для их описания используется осциллятор (van Gunsteren *et al.*, 1977).

Применение классических уравнений движения корректно только в условиях, когда длина волны Де Бройля  $\lambda = \sqrt{\frac{2\pi\hbar^2}{m k T}}$  много меньше размеров атомов и характерных межатомных расстояний. Это условие соблюдается для всех атомов органических веществ при комнатной температуре. Более

существенными являются размерные эффекты, поскольку невозможно по техническим причинам моделировать слишком большую систему частиц. С ростом размерности системы растет множественность числа состояний, времена релаксации неравновесных параметров. Все это требует больших времен траекторий МД. Преодоление этих ограничений потребовало значительных алгоритмических разработок. Реалистичные пакеты МД алгоритмов первого поколения были разработаны к середине 90-х годов и к настоящему времени получили широкое применение и развитие.

Потенциалы взаимодействия между атомами биополимера и растворителя определяют силовое поле. Современные молекулярно механические поля основаны на минималистской модели. Представлены только главные члены различных типов взаимодействий. Полная потенциальная энергия системы выражается через сумму вкладов отдельных термов:

$$\begin{aligned}
 V(r^N) = & \sum_{bonds} \frac{1}{2} k_{ij}^b (r_{ij} - b_{ij})^2 + \sum_{angles} \frac{1}{2} k_{ijk}^\theta (\cos(\theta_{ijk}) - \cos(\theta_{ijk}^0))^2 \\
 & + \sum_{dihedrals} k_\varphi (1 + \cos(n\varphi - \varphi_0)) \\
 & + \sum_{improper} k_\varepsilon (\varepsilon_{ijkl} - \varepsilon_0)^2 + \sum_{j=1}^{N-1} \sum_{i=j+1}^N \left\{ 4\epsilon_{ij} \left( \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right) + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right\} \quad (6)
 \end{aligned}$$

где первое слагаемое учитывает растяжение валентных связей, второе – колебания валентных углов, третье – энергию вращения вокруг двугранных углов, четвёртое – только колебание и пятое – потенциал Леннарда-Джонса.

Параметры силового поля:

- равновесная (основное состояние) структура идеального валентного остова

$b_{ij}$  – длины связей,  $\theta_{ijk}$  – величины валентных углов

- константы деформации длин связей и величин валентных углов

$k_{ij}^b$ ,  $k_{ijk}^\theta$

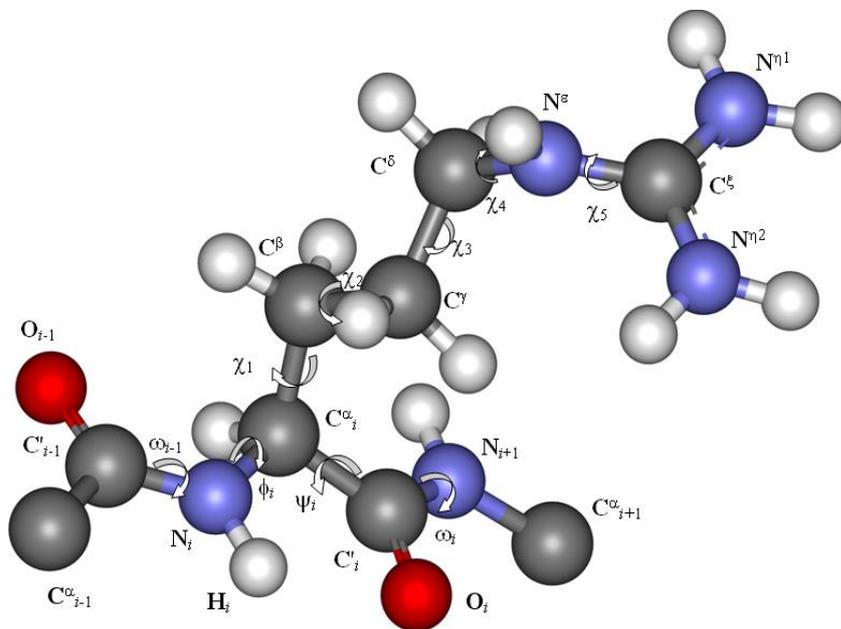
- параметры торсионных потенциалов внутреннего вращения,

$k_\varphi, n\varphi, \varphi_0$

- параметры Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий пар атомов

$\sigma_{ij}$

- заряды на атомах  $q_i$



**Рисунок 3.** Валентные углы полипептидной цепи: угол  $\varphi$  – между N и  $C_\alpha$  атомами, угол  $\psi$  – между  $C_\alpha$  и C' атомами, угол  $\omega$  – между C' и N атомами, угол  $\chi$  – между  $C_\alpha$  и  $C_\beta$  атомами. Серым цветом отмечены атомы углерода, красным – кислорода, синим – азота, белым – водорода.

Потенциальная энергия биополимера состоит из двух слагаемых: деформации валентного остова и взаимодействий между валентно не связанными атомами. В свою очередь энергия деформации валентного остова состоит из деформации длин валентных связей, валентных углов и вращений вокруг валентных связей – это первые три члена в формуле для энергии. Эти деформации аппроксимированы в гармоническом приближении и в виде главных членов ряда Фурье. Взаимодействия валентно не связанных атомов, то есть удаленных по цепи, аппроксимировано Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями, аналогично взаимодействию атомов инертных газов. Электростатические взаимодействия аппроксимированы монопольным приближением, как взаимодействие точечных зарядов центрированных на атомах. Совокупность констант деформации валентных связей и углов,

величины барьеров торсионных потенциалов, параметров Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и зарядов на атомах составляют параметры силового поля. Эти параметры определяются на основе совокупности термодинамических и спектроскопических экспериментальных данных для молекулярных кристаллов и жидкостей, а также и квантово-химических расчетов на большом наборе малых молекул, включающих всевозможные химические группы характерные для биополимеров. Применение силового поля, полученного из свойств малых молекул, для биополимеров, основано на гипотезе трансферабельности. То есть подобные химические группы в различных молекулах имеют одинаковые взаимодействия. Современные силовые поля второго поколения: OPLS (Kony *et al.*, 2002), CHARMM (Brooks *et al.*, 1983), AMBER (Kaminski *et al.*, 2003) и GROMOS (Collins *et al.*, 2005).

Основными источниками погрешности силовых полей второго поколения являются: 1) пренебрежение не аддитивными взаимодействиями, именно, электростатической поляризуемостью атомов локальным электростатическим полем и трехчастичными Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями; 2) форма Ван-дер-Ваальсова потенциала и комбинационные правила для параметров; 3) ограниченность монополярной аппроксимации электростатических взаимодействий. Эти погрешности могут не проявляться при оптимизации параметров силового поля на конденсированных гомогенных системах, однако, каждый из отмеченных моментов может вносить погрешности  $\sim 10\%$  в гетерогенной системе - макромолекула в водном растворе. Силовое поле следующего поколения должно быть простым по количеству параметров, но правильно отражать реалии физических взаимодействий.

### **1.5.2. Протокол молекулярно-динамического эксперимента**

Типичный протокол молекулярно-динамического численного эксперимента заключается в серии последовательных этапов (Durrant *et al.*, 2011). После построения исходной модели структуры и ее предварительной релаксации методами локальной оптимизации следует медленный разогрев системы, то есть назначение начальных скоростей атомам системы в соответствии с Максвелловским распределением  $\sim \exp(-mv^2/kT)$  при заданной температуре с последующими короткими МД симуляциями. При достижении требуемой температуры, проводится более длинная симуляция МД до достижения равновесия при заданных температуре и давлении. После этого выполняется длинная симуляция МД для результативного расчета конформационно-динамических характеристик. (Durrant *et al.*, 2011)

Моделирование конформационной динамики невозможно без расчета реалистичных траекторий движения атомов системы. В микроканоническом ансамбле полная энергия моделируемой системы должна сохраняться, то есть быть постоянной во времени. Сохранение полной энергии накладывает ограничение на максимальный шаг интегрирования уравнений движения порядка одной фемтосекунды ( $10^{-15}$  секунд), притом, что время сборки белка составляет порядка 1 секунды (Adcock *et al.*, 2006). Такой малый шаг интегрирования делает расчет содержательной МД траектории вычислительно трудоемкой задачей. Для ускорения интегрирования уравнений движения применяются многошаговые схемы интегрирования, которые основаны на разделении сил действующих на частицу на быстро и медленно меняющиеся. Например, деформация ковалентного остова биополимера даёт быстро изменяющиеся силы, тогда как электростатические взаимодействия с удаленными атомами изменяются более медленно. Быстрые и медленные силы можно пересчитывать с разными частотами и таким образом уменьшить операционную сложность вычислений (Adcock *et al.*, 2006).

Вторым моментом, определяющим содержательные возможности метода МД, является мощность вычислителей, скорость процессоров, емкость оперативной и дисковой памяти, возможность вести параллельный расчет конфигураций (Karplus *et al.*, 2002). Минимальная содержательная МД траектория должна быть в несколько раз больше времени релаксации системы – порядка 100 пикосекунд. Наносекундные времена моделирования биополимеров в растворе методами МД, систем из нескольких десятков тысяч атомов, являются обычными в настоящее время, в том числе на персональном компьютере с процессорами 1 ГГц и более. Однако наносекундные траектории являются недостаточными: для моделирования конформационных перестроек требуется число шагов на три порядка больше; для моделирования самоорганизации молекулы белка в 100-150 остатков требуется время большее на шесть порядков (Karplus *et al.*, 2002). Активное применение многопроцессорных систем и создание эффективных параллельных алгоритмов метода МД позволят, согласно прогнозам, в ближайшие 20 лет выйти на времена моделирования, эквивалентные 1 секунде. Это достижение будет представлять качественный скачок в информационной полезности методов МД в приложении к биологическим системам. Сегодняшняя роль молекулярной динамики – это исследование свойств твёрдых и жидких тел, свойств биополимеров, а также конструирование лекарственных препаратов (Karplus *et al.*, 2002).

### **1.5.3. Моделирование молекулярной динамики белка *in silico***

Метод молекулярной динамики впервые, опробованный в 70х годах XX века, сейчас используется довольно широко (Karplus *et al.*, 2005). Первое моделирование белка представляло собой моделирование белковой молекулы в вакууме. Далее развитие метода пошло по пути добавления растворителя с реальными физическими параметрами. Особенности этого процесса заключались в следующем: во-первых, происходило добавление молекул

определённого растворителя в пространство вокруг белка, во-вторых, добавление контр-ионов, в-третьих, более реалистичная обработка границ системы и, в-четвёртых, более аккуратная обработка электростатических взаимодействий. Каждый из этих пунктов предлагал осуществление нескольких альтернативных опций.

Моделирование биомолекулярной динамики находит сегодня три основных области применения (Karplus *et al.*, 2002). Во-первых, молекулярная динамика используется для того, чтобы проникнуть в суть процессов, происходящих в растворе с биомолекулами в реальных условиях. Во-вторых, моделирование молекулярной динамики предоставляет информацию о распределении термических свойств молекул. Согласно эргодической гипотезе, возможно провести моделирование молекулы вместе с её окружением в течение определённого периода времени и получить усреднённые свойства этой молекулы. Такой подход используется, например, для того, чтобы рассчитать объёмные свойства жидкостей и свободную энергию для таких химических процессов, как например, связывание лиганда (Chipot *et al.*, 2002). В-третьих, моделирование молекулярной динамики может помочь обнаружить, какая из конформаций молекулы или комплекса термически доступна и устойчива. В частности, поиск таких устойчивых конформаций используется для поиска оптимального взаимодействия при связывании молекулы белка и лиганда (Jiao *et al.*, 2009).

Развитие компьютерных технологий сделало возможными усовершенствования в основных методах моделирования. В частности, можно использовать гораздо более продолжительные этапы уравнивания и моделирования, так, в работе Дуана и соавт. было описано микросекундное моделирование белков (Duan *et al.*, 1998). Таким образом, можно оптимизировать силовые поля, для того, чтобы воспроизводить более сложные свойства, основанные на усреднённом моделировании, такие как свободная энергия сольватации.

В работе Руеда и соавт. (Rueda *et al.*, 2007) была предпринята попытка систематизировать имеющиеся средства моделирования и сравнить полученные результаты. Для рассмотрения были взяты четыре наиболее широко используемые силовые поля: OPLS (Kony *et al.*, 2002), CHARMM (Li *et al.*, 1997), AMBER (Kaminski *et al.*, 2003) и GROMOS (Collins *et al.*, 2005). Перед изучением самой динамики необходимо определить дают ли выбранные силовые поля схожие картины структуры белка и похожи ли эти данные на экспериментальные. Анализ собранных данных показал, что среднее отклонение между моделированием и экспериментальными данными составило  $2\text{\AA}$ , что может соответствовать температурным колебаниям. Причем наибольшее отклонение наблюдалось при использовании силовых полей GROMOS. Результаты также показали, что все проанализированные модели фактически испытывают схожие конформационные изменения в процессе численного эксперимента. Это предположение подтверждается анализом радиусов гирации белков и площадей поверхности доступной растворителю. Было обнаружено, что наличие или отсутствие дисульфидных мостиков не изменяло значения структурных отклонений RMSD между моделированными и экспериментальными структурами. Умеренное отклонение между траекториями молекулярной динамики и экспериментальной моделью может отражать недостаток качества некоторых участков экспериментальной модели, а также возможной разницей между экспериментальными условиями и условиями моделирования. Авторы заключают, тем не менее, что было бы некорректно считать, что отклонение экспериментальных данных и компьютерных моделей вызвано ошибками моделирования, так как в процессе проведенного анализа могли бы быть не учтены важные физические характеристики белков (Rueda *et al.*, 2007). Важно также отметить, что в процессе моделирования молекулярной динамики все нативные белок-белковые взаимодействия сохранились. Также сохранились вторичные структуры и общее число внутримолекулярных водородных связей, представленных в экспериментальных структурах, но

очевидно, они стали менее упорядоченными. Таким образом, разные силовые поля показали схожие результаты, и результаты моделирования оказались очень близки к экспериментальным. Различия между моделированием и экспериментальными данными свидетельствуют о том, что в белке присутствуют очень эластичные фрагменты, точная конформация которых не всегда чётко определена (Rueda *et al.*, 2007).

Оценка *B*-фактора или температурного фактора, который описывает смещение позиций атомов от среднего значения – это ещё один способ, применяемый для анализа локальных деформаций как контроль достоверности траекторий молекулярной динамики. Этот фактор является показателем температурных флуктуаций каждого отдельного атома. В своей работе (Rueda *et al.*, 2007) обнаружили, что между экспериментальными и полученными в результате моделирования *B*-факторами наблюдается корреляция. Более детальный анализ показал, что более высокая корреляция наблюдалась для силовых полей OPLS, CHARMM и AMBER, тогда как распределение *B*-фактора слегка смещено в область повышенных значений для GROMOS. Во всех случаях участки  $\beta$ -складок оставались наиболее жёсткими, тогда как повороты белковой цепи наиболее эластичными, что также подтверждалось экспериментальными данными. Исследование распределения *B*-фактора на разных белках показало хорошую корреляцию. Это показывает, что моделирование молекулярной динамики позволяет двигаться эластичным районам, которые были «заморожены» в кристаллической решётке.

#### **1.5.4. Изучение термостабильности белков методами молекулярной динамики**

Одна из интересных и актуальных задач, при решении которой интенсивно используется компьютерное моделирование – изучение термостабильности белковых молекул и влияния на нее точечных мутаций.

Ее актуальность обусловлена необходимостью дизайна термостабильных ферментов существующих белков, а ряд успешных применений компьютерного моделирования в этой области позволяют надеяться и на успешное использование моделирования в задачах, связанных с влиянием давлений на стабильность белков.

Среди таких методов используемых для дизайна термостабильных белков наиболее популярны методы, основанные на случайном мутагенезе или на сравнении ферментов с наиболее термостабильными гомологами. Но эти методы имеют некоторые ограничения: во-первых, требуется трудоёмкая подготовка многочисленных мутантов, а во-вторых, должны быть известны аминокислотные последовательности термофильных организмов. Многообещающая альтернатива для этих методов – это предсказание точечных мутаций, которые усиливают термостабильность белка, основанное на анализе их пространственных структур. В настоящее время описано очень много мутаций, которые как усиливают, так и снижают белковую термостабильность. Эффект влияния точечных мутаций на термостабильность часто связан с изменениями ионных взаимодействий в мутантном белке по сравнению с диким типом (Liu *et al.*, 2013; van Noort *et al.*, 2013). Кроме того, было обнаружено повышенное содержание заряженных остатков в белках термофильных организмов, по сравнению с их мезофильными аналогами, в большинстве случаев их молекулы имели пониженный квазидипольный момент.

Проблема термостабильности белков термофильных организмов часто связана с особенностями их динамики. Существует две противоположные точки зрения. Белки термофильных организмов считаются более устойчивыми и компактными по сравнению с белками мезофильных организмов. Однако в ряде работ было показано, что наоборот наиболее термостабильные белки могут иметь более эластичную структуру, чем их мезофильные аналоги. Поэтому исследователи дизайна точечных мутаций белка для повышения его термостабильности сталкиваются с дилеммой:

необходимо обращать внимание на увеличение эластичности мутантной молекулы по сравнению с диким типом или сделать попытку получить более жёсткую молекулу.

В работе Polyansky *et al.*, 2004 был предложен новый подход, который позволяет определять термолабильные районы белковой молекулы, то есть те, которые неустойчивы к тепловому воздействию. В этих районах наблюдается значительное повышение эластичности при повышении температуры. Денатурация молекулы начинается в определённых точках, поэтому обнаруженные термолабильные районы могут быть потенциальными районами, которые в большей степени подвержены денатурации. В результате термостабильность белковой молекулы будет зависеть от наличия таких районов (Lazaridis *et al.*, 1997). В свою очередь, точечные мутации, направленные на усиление термостабильности белка, должны быть спланированы с учётом их эффекта на повышение эластичности, вызванную температурой, в этих районах.

В этой работе использован метод компьютерного моделирования молекулярной динамики белковых молекул для определения термолабильных районов. В своих моделированиях они использовали явный растворитель, температурный диапазон составлял 300-373К. В качестве модели исследования были взяты два гомологичных тиреодоскина с известными пространственными структурами. Один из них был взят из мезофильной *Escherichia coli* (Katti *et al.*, 1990), а другой из термофильной бактерии *Bacillus acidocaldarius* (Nicastro *et al.*, 2000). В результате моделирования молекулярной динамики в течение 2,5 наносекунд было получено 20 моделей. Во всех моделированиях пространственная структура белков оставалась стабильной и устойчивой. Значения среднеквадратичного отклонения RMSD атомов относительно исходных структур составили 2,0-2,4Å для температуры 300К и 2,1-2,7Å для 373К. При повышенной температуре не происходила необратимая денатурация. Полученные

результаты свидетельствуют о том, что белки, взятые из термофильной бактерии, являются более термоустойчивыми по сравнению с белками *E.coli*.

Результаты этих работ показывают, что методы молекулярной динамики могут быть успешно использованы для изучения механизмов изменения стабильности белков как в результате повышения температуры, так и в результате мутаций.

### **1.5.5. Моделирование белков в условиях повышенных давлений**

Возможности методов молекулярной динамики нашли широкое применение и для изучения влияния высокого давления на структуру белков. Этому способствовали разработка методов, позволяющих моделировать динамику белка при постоянном давлении.

При моделировании молекулярной динамики в настоящее время возможно использование нескольких алгоритмов моделирования давления. Например, алгоритм Берендсена (Berendsen *et al.*, 1984), алгоритм Parrinello-Rahman (Parrinello *et al.*, 1981).

Алгоритм Берендсена (Berendsen *et al.*, 1984) масштабирует координаты и размер ячейки моделирования каждый шаг с помощью матрицы, которая влияет на эти величины (координаты и размер) со степенью, пропорциональной разнице текущего давления  $P_0$  и требуемого давления  $P$ :

$$\frac{dP}{dt} = \frac{P_0 - P}{\tau_p} \quad (7)$$

где  $\tau_p$  - это константа времени релаксации баростата. Это приводит к вариациям размеров ячейки и на каждом шаге моделирования объем ячейки масштабируется фактором  $\eta$ :  $\eta(t) = 1 - \frac{\Delta t}{\tau_p} \gamma (P_0 - P)$ , где  $\gamma$  - это изотермическая сжимаемость системы.

Алгоритм Parrinello-Rahman (Parrinello *et al.*, 1981) позволяет моделировать давление в ячейках различной формы. Хорошо подходит для твердых тел, так как позволяет моделировать фазовые переходы. Ячейка

моделирования может иметь произвольную форму, которая описывается тремя векторами  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , которые могут иметь разную длину. Объем ячейки описывается следующим уравнением:  $V = \det \mathbf{H} = a \cdot (b \times c)$ , где  $\mathbf{H} = \{a, b, c\}$  это матрица размером  $3 \times 3$ . Координаты молекул через масштабируемые переменные:  $r_i = \mathbf{H} s_i$ . И уравнения движения выглядят как:  $\ddot{s}_i = \frac{\mathbf{H}^{-1} f_i}{m} - G^{-1} \dot{G} \dot{s}$ ,  $\dot{H} = \frac{(P - P_0) V (\mathbf{H}^{-1})^T}{Q}$ , где  $Q$  это флуктуации объема, а  $G = \mathbf{H}^T \mathbf{H}$  это метрический тензор.

Использование методов молекулярной динамики для изучения влияния высокого давления на структуры белков началось с появлением первых достаточно надежных компьютерных программ, позволяющих моделировать молекулы при высоких давлениях. Так, в работе Paci с соавтором исследуется изменение объема белковых молекул лизоцима и супероксиддисмутазы в процессе моделирования длиной 120 пикосекунд при давлении 1, 1000 и 2000 МПа (Paci *et al.*, 1996).

В работе Collins *et al.*, 2005 исследовалось влияние высокого давления на поведение мутантного лизоцима фага T4. Структура белка была определена методом кристаллографии. Дополнительно было проведено компьютерное моделирование молекулярной динамики белка. Для компьютерного моделирования использовались силовые поля AMBER, уже упоминавшиеся выше. Моделирование проходило при комнатной температуре в диапазоне давлений 0,1-200 МПа и в течение 300 пикосекунд. Данный интервал времени был выбран в таких пределах, поскольку именно такой временной промежуток соответствует небольшим флуктуациям в структуре белка, которые не нарушают целостность и функциональность его структуры. Конкретно в этой работе исследователей заинтересовал факт возможности образования в структуре белка небольшой полости, в которую теоретически могут проникать молекулы растворителя, а в данном случае воды. Итак, кристаллическая структура мутантного лизоцима фага T4 была определена при различных давлениях. Сравнение индивидуальных структур

при различных давлениях показало, что отклонение атомов основной цепи от равновесного состояния составляет не более  $0,1\text{\AA}$ . При повышении давления от  $0,1\text{ МПа}$  до  $200\text{ МПа}$ , наблюдалось увеличение числа небольших, но статистически существенных изменений. Наибольшим изменениям подвергалось смещение N-терминального домена белка относительно C-терминального и составляло порядка  $0,25\text{\AA}$ . Также наблюдалась смещение спирали C относительно основной цепи на  $0,25\text{\AA}$ . Несмотря на эти изменения и другие небольшие деформации, полость внутри белка увеличилась на 3% при  $200\text{ МПа}$ .

Моделирование молекулярной динамики показало, что полость, ограничивающая своими флуктуациями проникающие в неё молекулы воды, может содержать до пяти молекул, которые могут впоследствии образовывать водородные связи. Также интересно то, что образуются водородные связи с карбонильным кислородом основной цепи ALA99. Этот аланин является результатом замены LEU99 в белке дикого типа. Результаты моделирования показали, что молекулы воды проникали в полость белка через временное отверстие, образующееся между остатками PHE114, SER116, ASN132 и LEU133. Таким образом, проникновение воды в полость лизоцима связано с его динамикой и, фактически, с флуктуациями остатка PHE114. Оказалось, что кристаллографическое значение B-фактора для боковой цепи PHE114, в два раза больше чем для всех остальных фенилаланинов в кристаллической структуре данного белка. Также было обнаружено, что небольшие изменения химического потенциала воды в объёмной фазе являются достаточными, чтобы вызвать заполнение половины полости. Такое двухфазное поведение обнаруживает возможность сосуществования жидкой и газообразной воды при нормальных условиях. Поэтому заполнение полости при нормальных условиях может быть вызвано снижением средней энергии взаимодействия воды с окружающим белком через изменение электростатических показателей полости.

В работе Trzesniak *et al.*, 2006 проводилось моделирование молекулярной динамики Arc-репрессора в условиях повышенного давления. Естественный путь изучения стабильности и процесса разворачивания белков экспериментально или теоретически заключается в варьировании термодинамических условий окружающего растворителя. Главным образом используются три способа (Smith, 2004): изменение температуры, давления или состав растворителя путём добавления ионов изменяющих общий заряд системы (Zhang *et al.*, 2001). В нормальных условиях рассматриваемый в данной работе этот ДНК связывающий белок представляет собой димер с 53 аминокислотными остатками в каждой цепи. Две цепи взаимодействуют посредством антипараллельных  $\beta$ -листов, которые также участвуют в связывании ДНК (Breg *et al.*, 1990). Моделирование осуществлялось программой GROMOS96, в силовом поле GROMOS 45A3 (Schuler *et al.*, 2001). Белок был помещён в центр ячейки, заполненной растворителем при температуре 298К. Моделирование проводилось на протяжении 500 пикосекунд, при температурах 300, 350, 400 и 450К и давлении от 0,1 МПа до 1000МПа. Результаты показали, что значение среднеквадратичного отклонения RMSD при температуре 300К и атмосферном давлении оставалось на уровне 0,2 нм на протяжении всего моделирования. Начиная с 400К, белок терял свою структуру, и наблюдалась денатурация. Увеличение давления до 1000МПа при нормальной температуре не давало никаких особых изменений в структуре репрессора. И даже при 400К и 1000МПа не наблюдалась денатурация белка, хотя присутствовало колебание значения RMSD.

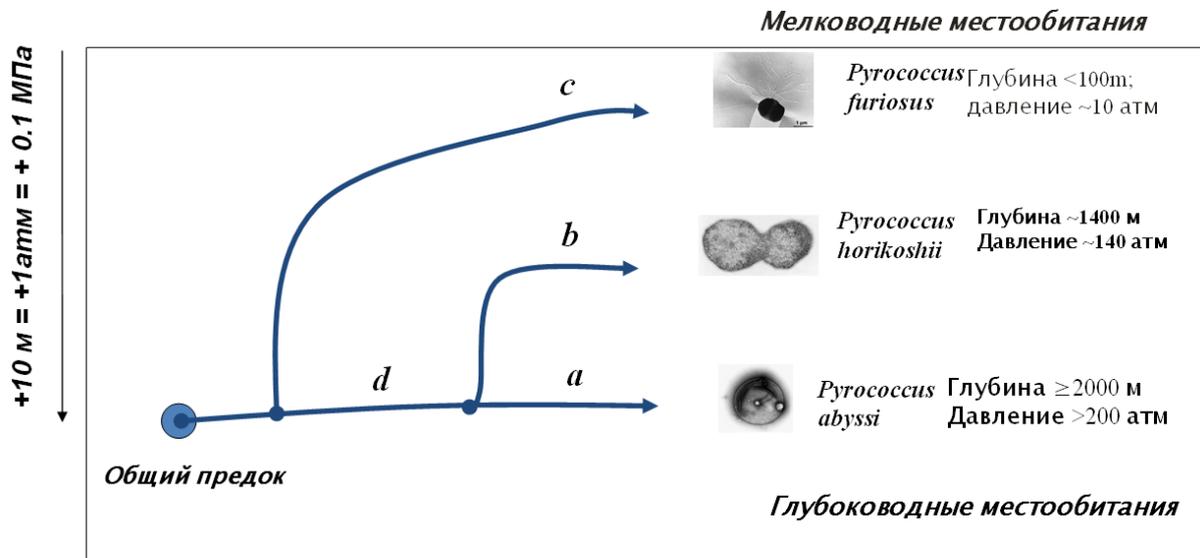
Результаты приведённых работ и их согласие с результатами, полученными экспериментальными методами показывают, что методы молекулярной динамики могут быть эффективно использованы для моделирования поведения моделей белковых структур при повышенных давлениях *in silico*.

## 1.6. Краткая характеристика архей рода *Pyrococcus*

Археи рода *Pyrococcus* – обитатели гидротерм океана. Их сравнительное исследование вызывает большой интерес, поскольку уже полностью известны геномные последовательности трех видов: *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii* и *Pyrococcus abyssi*. Эти виды имеют сходные условия оптимального роста по температуре (~100° C), солености, pH (Fiala *et al.*, 1986). Хотя все три организма могут размножаться и при давлениях, близких к атмосферному, условия глубины местообитаний и оптимальных гидростатических давлений для них различаются.

Ранее была проведена работа по сравнению последовательностей генов кодирующих белки данных экстремофильных архей рода *Pyrococcus* (*P. abyssi*, *P. horikoshii*, *P. furiosus*) (Gunbin *et al.*, 2009). Эти морские организмы являются обитателями гидротермальных источников. Два из них населяют океанские глубины: *P. abyssi* на глубине 2200 м, где давление составляет ~20 МПа, *P. horikoshii* на глубине 1400 м, с давлением ~14 МПа (Zeng *et al.*, 2009). *P. furiosus* населяет мелководные гидротермальные источники (Fiala *et al.*, 1986) при давлении близком к атмосферному. Эти виды дивергировали от общего глубоководного предка в процессе эволюции (Gunbin *et al.*, 2009). В работе Гунбина с соавторами был проведен поиск генов, которые были подвержены позитивному отбору на разных этапах эволюции рода *Pyrococcus*. В качестве критерия Дарвинского позитивного отбора использовалось отношение  $d_R/d_C$ , которое выражало долю фиксирующихся радикальных несинонимичных замен аминоксилот (Zhang *et al.*, 1998; Zhang, 2000). Смена субстратного предпочтения, по-видимому, шла в ходе эволюции *P. abyssi* и *P. horikoshii* постепенно, как на ветви *d* (где обнаружено значимое преобладание движущего отбора), так и после дивергенции ветвей *a* и *b* (значимое преобладание движущего отбора для генов *P. abyssi*) как показано на рисунке 4. В результате было обнаружено, что на стадии дивергенции *P. furiosus*, радикальные замены в большей степени в белках

связанных с «трансляционной машиной» и «рибосомальной функцией». Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе этого способа эволюции и обеспечения адаптации к изменившимся значениям давления остаются неясными.



**Рисунок 4.** Эволюционная история бактерий рода *Pyrococcus* (*P. furiosus*, *P. horikoshii* и *P. abyssi*). Показан порядок дивергенции видов от общего предка, глубины их местообитаний и предельные значения давлений, при которых эти виды выживают. В ходе эволюции *P. horikoshii* (ветвь *b*) также происходит потеря оперонов синтеза важных аминокислот и возникает способность потреблять пептиды и аминокислоты из внешней среды (Gunbin *et al.*, 2009).

### 1.7. Белок Nip7 *Pyrococcus abyssi*

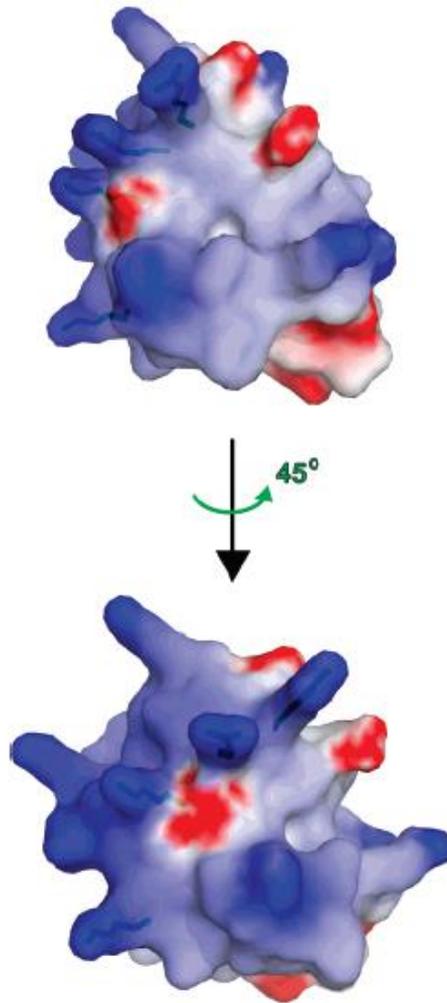
Для исследования изменений структурных свойств белка при повышенных давлениях были выбраны белок Nip7 *Pyrococcus abyssi* (пьезофильного организма, проживающего при давлениях около 20 МПа) и его гомолог у *Pyrococcus furiosus* (организма, при давлениях, близких к атмосферным). Эти белки были выбраны по следующим причинам. Во-первых, для них был идентифицирован режим движущего отбора в ходе эволюции архей *Pyrococcus*, кластер белков №665 (Gunbin *et al.*, 2009). Следовательно, его функция может быть важной для адаптации организмов к изменению давления. Во-вторых, для гомолога *Pyrococcus abyssi* известна

пространственная структура (Coltri *et al.*, 2007, идентификатор PDB 2P38). В-третьих, длина его полипептидной цепи невелика, составляет 166 аминокислотных остатков, что приемлемо для моделирования структуры методом молекулярной динамики. В-четвертых, последовательности Nip7 *Pyrococcus abyssi* и его гомолога у *Pyrococcus furiosus* выравниваются без делеций/вставок, уровень сходства последовательностей составляет около 75%, что позволяет смоделировать пространственную структуру гомолога у *Pyrococcus furiosus* без реконструкции петель (этапа предсказания структуры белка по гомологии, который вносит существенные ошибки).

Консервативный белок Nip7 вовлечён в биогенез рибосом и участвует в процессинге 27S пре-рРНК и в образовании 60S субъединицы рибосом (Bassler *et al.*, 2001). Атомная модель данного белка содержит два независимых мономера и 252 молекулы воды. Мономеры расположены симметрично относительно друг друга, ориентация «голова к хвосту» и, не выявляя каких-либо структурных различий, формируют димер. Пространство между мономерами составляет порядка 700 Å<sup>2</sup> поверхности доступной растворителю на молекулу или 8% от общей поверхности. Эти значения позволили авторам предположить, что димерная структура была образована в результате кристаллизации и не имеет биологической значимости (Coltri *et al.*, 2007).

Мономеры белка Nip7 составлены из двух альфа-бета доменов. Массивный N-терминальный домен состоит из пяти антипараллельных β-листов, окруженных тремя α-спиралями и одной спиралью 3<sub>10</sub>. C-терминальный домен, который является РНК-связывающим доменом, включает аминокислотные остатки с 95 по 159 и состоит из смешанных β-листов, одной α-спирали и одной короткой спирали 3<sub>10</sub> (Coltri *et al.*, 2007).

Результаты исследования показали, что аминокислоты аргинин и лизин, входящие в состав C-терминального PUA домена (R151, R152, K155, K158), формируют положительно заряженную область, которая способствует связыванию белка и РНК (Coltri *et al.*, 2007).



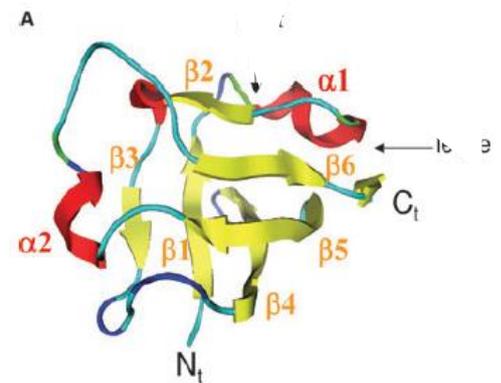
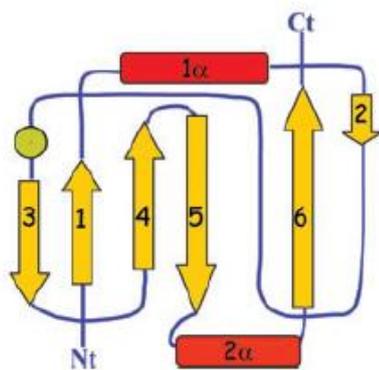
**Рисунок 5.** Электростатическая поверхность С-терминального домена белка Nip7 *Pyrococcus abyssi*. Красным отмечены отрицательно заряженные области, синим – положительно заряженные (Coltri *et al.*, 2007).

### 1.8. PUA домен

PUA домен - псевдоуредин синтазный и археозин трансглюкозилазный домен, который является очень консервативным РНК-связывающим мотивом и широко распространён среди организмов всех трёх царств. Чаще всего данный домен встречается у ферментов, которые катализируют пост-транскрипционные изменения тРНК и рРНК, как псевдоуредин синтазы, археозин тРНК-гуанин трансглюкозилазы и РНК метилтрансферазы. Однако список белков, содержащих PUA домен, очень большой и разнообразный и включает сульфат редуктазы архей, глутамат киназы бактерий и дрожжей и

белки, вовлеченные в биогенез рибосом и инициацию трансляции (Perez-Arellano *et al.*, 2007).

Впервые трёхмерная структура PUA-домена была получена для фермента АркТГТ (PBD код 1IQ8; Ishitani *et al.*, 2002). С тех пор информация об этом домене с каждым годом значительно увеличивалась. В настоящее время в базе данных Pfam (Finn *et al.*, 2006) присутствуют приблизительно 600 белков различных семейств, содержащих PUA домен. Как правило, PUA домен состоит из 67-94 аминокислотных остатков и имеет  $\alpha/\beta$  архитектуру. В фолде присутствуют шесть  $\beta$ -листов, формирующих так называемый  $\beta$ -сэндвич (Рисунок 6).



**Рисунок 6.** Укладка типичного PUA домена.

*B*-сэндвич имеет топологию 3-1-4-5-6-2 и закрыт с одной стороны короткой спиралью  $3_{10}$ .

PUA домены всегда контактируют с молекулой РНК используя глицин-содержащую петлю между  $\alpha$ -спиралью 1 и  $\beta$ -листом 2, а также остатки локализованные возле петли  $\beta$ -листа 6. Основная цепь петли  $\alpha_1$ - $\beta_2$  и петли  $\beta_6$  расположены рядом друг с другом в трёхмерной структуре домена и формируют выступ, который обеспечивает возможность домену узнавать борозды двухцепочечных молекул РНК. В зависимости от взаимного расположения и типа боковых групп остатков в петлях  $\alpha_1$ - $\beta_2$  и  $\beta_6$ , PUA домен способен связываться с РНК различными способами.

Общая архитектура PUA домена очень схожа с таковой у олигонуклеотид/олигосахарид-связывающего (ОВ) домена, который состоит

из пяти скрученных  $\beta$ -листов покрытых  $\alpha$ -спиралью (Theobald *et al.*, 2003). Этот домен использует только два  $\beta$ -листа в качестве связывающей поверхности и преимущественно распознаёт одноцепочечные молекулы ДНК и РНК.

PUA мотивы обычно формируют часть мультидоменных белков расположены, например, в С-терминальном домене псевдоуредин синтаз, гуанин трансглюкозилаз или в N-терминальном домене РНК метилтрансфераз, фосфоаденозин фосфосульфат редуктаз и эукариотических факторах инициации трансляции (Aravind *et al.*, 1999).

Псевдоуредин это наиболее распространённый модифицированный РНК нуклеозид во всём живом мире, присутствующий в рРНК, тРНК и мяРНК (Hamma *et al.*, 2006). Распространенность псевдоуредина, как полагают, способствует стабильности и лучшей сворачиваемости РНК, и осуществляется группой ферментов псевдоуредин синтаз, которые катализируют пост-транскрипционные преобразования специфических уридинов. Эти ферменты обнаруживающие консервативные активные сайты, а также широкий спектр РНК-связывающих стратегий, классифицированы в пять семейств, названных по их самому распространённому представителю: TruA, TruB, TruD, RluA и RsuA (Hamma *et al.*, 2006). PUA домен наблюдается только в представителях семейства TruB. Эти белки содержат каталитический домен и С-терминальный PUA домен. В это семейство также входит белок Cbf5 (называемый дискерином у людей), который псевдоуридилирует рРНК у архей и эукариот (Gutgsell *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2002).

Известно, что ряд мутаций PUA доменов ассоциированы с заболеваниями. Например, мутации внутри PUA домена белка диксерина, который входит в состав человеческой теломеразы, приводят к болезни костного мозга - врождённому дискератозу (Heiss *et al.*, 1998). А PUA мотив в человеческом белке онкогена МСТ-1 играет ключевую роль в регуляции

трансляции (Reinert *et al.*, 2006). Интересно, что во многих других белках функция домена неизвестна.

### **1.9. Функции белка Nip7 и его близких гомологов.**

Гомологи белка Nip7 широко представлены среди архей и эукариот. Необходимо отметить, что функция белка в разных организмах может варьироваться, а где-то она до сих пор остается не выясненной. Самым близким эукариотическим гомологом белка Nip7 является белок Nip7p *S.cerevisiae*. Этот белок необходим для процессинга 27S пре-рРНК и, как следствие, для формирования зрелых 25S и 5.8S рРНК, а также для сборки 60S субъединицы рибосом у *S.cerevisiae*. Кроме того, он взаимодействует с ядерными белками и субъединицей экзосомы Rrp43p (Coltri *et al.*, 2007). Rrp43p является компонентом экзосомы, комплекса 3- 5- экзонуклеаз, субъединицы которой участвуют в процессинге 5,8 S рРНК и обороте мРНК (Zanchin *et al.*, 1999).

Экзосомы про- и эукариот имеют различное строение и играют важную роль в функционировании белка Nip7. Ядро экзосомы архей состоит из четырех типов субъединиц: Rrp41, Rrp42, Rrp4, Cs14, которые могут собираться в комплекс структурно схожий с экзосомой эукариот, состоящей из 9-ти субъединиц. Экзосома архей из 9-ти субъединиц состоит из трех Rrp41, трех Rrp42 и трех Rrp4 и/или Cs14. Rrp41 и Rrp42 формируют каталитически активное гексамерное кольцо, на вершине которого располагаются три Rrp4 и/или Cs14, формируя РНК-связывающий кэп с центральной полостью. Иногда в составе экзосом ещё встречаются белки DnaG, Crp и Cdc48 (Evgenieva-Hackenberg, 2011). Важно заметить, что белки Rrp4 и Cs14 являются консервативными как для экзосом архей, так и эукариот, что предполагает особую роль данных белков, вероятно, в узнавании субстрата. Кроме того, отдельно взятые субъединицы экзосомы не

проявляют никакой РНКазной активности *in vitro* (Evguenieva-Hackenberg, 2011).

Во многих организмах, например у *S.cerevisiae*, присутствуют белки-партнеры, которые взаимодействуют с Nip7p – это Nor8p и Nor53p, функция которых также до конца не ясна. (Coltri *et al.*, 2007). Известно, например, что в клетках с пониженным содержанием белка Nor8p наблюдается: снижение уровня свободных 60S рибосом, накопление 35S пре-рРНК и aberrантных 23S пре-рРНК, отсутствие накопления 25S и 27S рРНК. В клетках с пониженным содержанием белка Nip7p наблюдаются такие же процессы, за исключением того, что такие клетки ещё аккумулируют 27S пре-рРНК (Zanchin *et al.*, 1999).

Взаимодействие между белками Nip7p и Nor8p сохраняется и у человеческих ортологов. Человеческий HsNip7 имеет 57% сходства по аминокислотному составу с Nip7p дрожжей. Человеческий Nor132 имеет гомологичную функцию с Nor8p и также связывается с HsNip7 (Sekiguchi *et al.*, 2004). Кроме того, человеческий белок HsNip7 может связываться с белком SBDS (Shwachman–Bodian–Diamond syndrome associated protein). HsNip7 и SBDS могут функционировать в тесной связи, возможно, как часть единого комплекса рибонуклеопротеинов необходимых для созревания 60S субъединицы у эукариот (Hesling *et al.*, 2007). У архей же белки SBDS и Nip7, которые предпочтительно связывают поли-А и AU-богатые участки РНК, влияют на активность экзосомы *P.abysssi in vitro*. SBDS ингибирует деградацию поли-рА субстрата, Nip7 ингибирует деградацию поли-А и поли-AU на экзосомах (Luz *et al.*, 2010).

Как было сказано выше, экзосомы архей могут иметь разный состав по субъединицам Csl4 и Rrp4. Белок Nip7 архей имеет большую аффинность к экзосоме, в составе которой присутствует субъединица Csl4, чем к экзосоме с субъединицей Rrp4. Эти данные подтверждают тот факт, что Nip7 имеет больший ингибиторный эффект на экзосому с субъединицей Csl4. В то время как белок SBDS архей ингибирует в основном экзосому с субъединицей Rrp4

(Luz *et al.*, 2010). Вероятно, Nip7 связывается с РНК с помощью С-терминального PUA домена и взаимодействует с экзосомой с помощью N-терминального домена, тем самым контролируя её функцию (Luz *et al.*, 2010). Nip7 может взаимодействовать с доменом Zn-ribbon экзосомы Csl4, который может быть вовлечен во взаимодействие с белками, тем самым осуществляя механизм регуляции экзосомы (Luz *et al.*, 2010).

Механизм регуляции экзосомы, по-видимому, выглядит следующим образом: Белок SBDS конкурирует с экзосомой за связывание с поли-А РНК, тем самым ингибируя деградацию РНК экзосомой. Nip7 взаимодействует преимущественно с U- и AU-богатыми РНК и тем самым ингибирует взаимодействие с ними экзосомы в результате того, что связывается как с экзосомой, так и с РНК. Это показывает, что белки SBDS и Nip7 могут быть регуляторными факторами активности экзосом. Это первый описанный пример белков архей, регулирующих экзосому с помощью ингибирования (Luz *et al.*, 2010).

## **1.10. Методы сравнительного анализа аминокислотных последовательностей для выявления механизмов адаптации белков к экстремальным условиям.**

### **1.10.1. Анализ аминокислотного состава белков термофильных и мезофильных организмов**

С появлением информации об аминокислотных последовательностях экстремофильных организмов стало возможным на основе их сравнения с ортологами из мезофильных организмов выявлять особенности последовательностей и структур, обеспечивающих молекулярную адаптацию к экстремальным условиям среды.

Как правило, исследователи на основе сравнительного анализа, решают две основных задачи: (1) определяют изменения в аминокислотном составе протеомов экстремофилов, обеспечивающие такую адаптацию и (2)

проводят поиск конкретных аминокислотных замен в структуре белка, которые обеспечивают его повышенную стабильность в экстремальных физиологических условиях.

Изменение термостабильности белков, в основном, связывают с действием двух механизмов (Berezovsky *et al.*, 2007). Один из этих механизмов связан со структурными факторами, которые увеличивают компактность белков, а другой – с существенными модификациями аминокислотных последовательностей белков.

Важность различных факторов, дающих вклад в термостабильность белка, является предметом интенсивных исследований. На термостабильность белка могут оказывать влияние многие структурные свойства (Berezovsky *et al.*, 2007; Robinson-Rechavi *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2005): число водородных связей, число солевых мостиков, площадь поверхности доступной растворителю, размер полипептидной цепи, доля остатков в белке, вовлеченных в различные элементы вторичной структуры ( $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -структуры) и т.п.

В работе И.Н.Березовского и Е.И. Шахновича (Berezovsky *et al.*, 2007) было показано, что выбор механизма повышения термостабильности белков, во многом зависит от эволюционной истории организма. Белки из организмов, изначально обитающих в экстремальных условиях окружающей среды, более компактны, и увеличение стабильности осуществляется за счет структурных факторов. Те же организмы, которые изначально были мезофилами, а затем, в процессе эволюции, поменяли условия среды обитания на более теплые, имеют механизм термостабильности, основанный на модификации аминокислотной последовательности.

Для всех белков число солевых мостиков коррелирует с таким параметром как отношение числа заряженных остатков к полярным (Altschul *et al.*, 1990). Чем это отношение выше, тем больше в белке солевых мостиков. Но число солевых мостиков в большей степени зависит от того,

как заряженные остатки располагаются в пространственной структуре белка. Большое количество солевых мостиков было найдено в термофилах, особенно внутри спиралей (Altschul *et al.*, 1990).

В работе Глякиной с соавторами (Глякина и др., 2007) была исследована выборка из 245 пар гомологичных белков из термофильных и мезофильных организмов. Было показано, что внутренние остатки термофильных и мезофильных белков не отличались по своему аминокислотному составу. Среди внешних же остатков термофильных белков наблюдалось повышенное содержание таких аминокислот, как лизин, аргинин и глутаминовая кислота. Этим аминокислотам также больше содержалось среди внешних остатков термофильных белков по сравнению с мезофильными гомологами. И, наоборот, среди внешних остатков мезофильных белков наблюдалось повышенное содержание аланина, аспарагиновой кислоты, глутамина и треонина по сравнению с мезофильными гомологами. Интересно отметить, что термофильные и мезофильные белки не отличались по числу межатомных контактов на остаток при контактном расстоянии 3 Å, а среднее число солевых мостиков у них больше, чем в мезофильных белках. Таким образом, солевые мостики дают вклад в стабильность термофильных белков, но ими полностью нельзя объяснить увеличение числа межатомных контактов в термофильных белках по сравнению с мезофильными (Глякина и др., 2007).

Эти данные также подтверждаются в работе Березовского с соавторами (Berezovsky *et al.*, 2007): анализ выборки бактериальных протеомов показал, что протеомы термофильных бактерий насыщены гидрофобными (изолейцин, лейцин, тирозин, валин, триптофан) и заряженными аминокислотами (аргинин, глутамат), в то время как встречаемость полярных остатков ниже, по сравнению с мезофильными белками.

В работе Di Giulio (Di Giulio, 2005) при сравнении двух видов архей пьезофила *Pyrococcus furiosus* и пьезофила *Pyrococcus abyssi* были выявлены различия в процессе аминокислотных замен: аргинин, серин,

глицин, валин и аспарат чаще встречаются у пьезофильной археи, чем у непьезофильной. Наоборот тирозин и глутамин встречаются значительно реже у пьезофильной археи, чем у непьезофильной. Также было показано, что наиболее полярные аминокислоты являются более пьезофильными, в то время как аминокислоты, обладающие высоким молекулярным весом, являются менее пьезофильными (Di Giulio, 2005).

### **1.10.2. Анализ аминокислотных остатков специфичных к температуре и давлению у термофильных и мезофильных организмов**

Описанные выше подходы позволили выявить общие закономерности изменения аминокислотного состава, характерные для термофильных и пьезофильных организмов. Существуют методы, которые позволяют оценивать вклад замен в отдельных позициях белков на их термостабильность. Этот анализ основан на выявлении позиций, замены в которых происходят специфическим образом, по отношению к белкам, относящихся к разным группам организмов.

Анализ основан на том, что для множественного выравнивания гомологичных белков, разбитых на несколько функциональных групп, характерны следующие типы столбцов выравнивания (Kalinina *et al.*, 2004; Bharatham *et al.*, 2011; Terra *et al.*, 2012; Chakraborty *et al.*, 2014) (Рисунок 7)

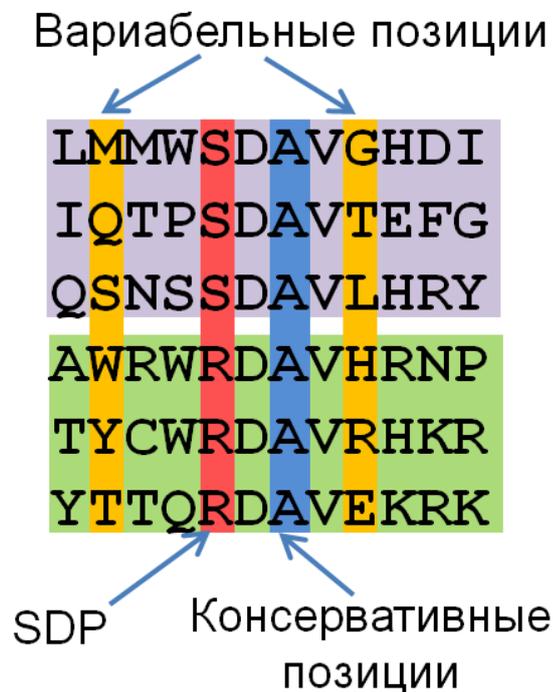
(1) Консервативные позиции, аминокислоты в которых совпадают между группами белков. Предполагается, что мутация аминокислоты в этой позиции приводит к существенному нарушению функции белка или понижению его стабильности.

(2) Вариабельные позиции, аминокислоты в которых различаются как между группами белков, так и внутри них. Предполагается, что мутации в этих позициях слабо влияют на стабильность и функцию белков.

(3) Специфичные позиции (SDP, specificity determining positions),

аминокислоты в которых одинаковы внутри каждой из групп и различаются между группами гомологичных белков.

На практике, в выравнивании из нескольких десятков последовательностей (и более) определить позиции, относящиеся к 3-й группе достаточно сложно, поскольку точное соответствие разных аминокислот разным группам белков встречается крайне редко. Поэтому, для выявления таких позиций используются методы статистического анализа.



**Рисунок 7.** Пример вариабельных, консервативных и специфичных (SDP) позиций в выборке гомологичных белков.

Анализ специфических замен осуществлялся с помощью сервера SDPPred <http://bioinf.fbb.msu.ru/SDPpred/> (Kalinina *et al.*, 2004) и программы GroupSim (Capra *et al.*, 2008). Выборка белков была разделена на две подвыборки по глубине обитания архей: мелководные и глубоководные. Организмы, обитающие на глубине 1000м и ниже были отнесены к глубоководным, остальные – к мелководным.

Один из подходов к такому анализу был реализован в программе SDPPred (Kalinina *et al.*, 2004). Эта программа использует множественное

выравнивание белковых последовательностей, разделенных на  $N$  групп с номерами  $i=1, \dots, N$ . Необходимо идентифицировать столбцы (позиции) в выравнивании, в которых распределение аминокислот тесно связано с группировкой по специфичности. Взаимосвязь типов аминокислот в столбце и номера группы оценивается через количество информации:

$$I_p = \sum_{i=1}^N \sum_{\alpha=1}^{20} f_p(\alpha, i) \log \frac{f_p(\alpha, i)}{f_p(\alpha) f(i)} \quad (8)$$

, где  $\alpha=1, \dots, 20$  это тип аминокислоты,  $f_p(\alpha, i)$  это отношение числа вхождений остатка в группу  $i$  в позиции  $p$  к полному объему выборки,  $f_p(\alpha)$  - частота встречаемости остатка в столбце выравнивания,  $f(i)$  - доля белков принадлежащих к группе  $i$ .  $I_p$  отражает статистическую связь между двумя дискретными случайными величинами типом аминокислоты  $\alpha$  и номером группы белковой последовательности  $i$ .

В некоторых случаях в столбцах выравнивания могут не быть представлены все 20 типов аминокислот. В методе Калининой для оценки вероятности наблюдать аминокислоту  $\alpha$  в группе  $i$  используется оценка:

$$\tilde{f}(\alpha, i) = \frac{n(\alpha, i) + \kappa \left( \sum_{\beta=1}^{20} n(\beta, i) m(\beta \rightarrow \alpha) \right) / \sqrt{n(i)}}{n(i) + \kappa \sqrt{n(i)}} \quad (9)$$

, где  $m(\beta \rightarrow \alpha)$  это вероятность аминокислотной замены ( $\beta \rightarrow \alpha$ ) в соответствии с матрицей, оцененной по группе  $i$ ,  $0 \leq \kappa \leq 1$  это смягчающий параметр.

Для того чтобы рассчитать статистическую значимость полученных значений  $I_p$ , численный тест с перестановками: аминокислоты в каждом столбце перемешиваются случайным образом, по этим данным оценивается функция распределения  $F(I^{sh})$ . Чтобы компенсировать изначальное сходство белков, которое выше внутри групп, чем между группами, рассчитывается ожидаемая общая информация для столбца  $p$ :  $I^{exp} = aI^{sh} + b$ , где  $a$  и  $b$  не зависят от позиции, то есть одинаковы для каждой позиции выравнивания, таким образом:

$\sum_{i=1}^L (I_i - \langle I_i^{exp} \rangle)^2 = \sum_{i=1}^L (I_i - a \langle I_i^{sh} \rangle - b)^2 \rightarrow \min$ , где  $L$  это общая длина выравнивания,  $I_i$  – общая информация для  $i$ -ого столбца. После чего вычисляется Z-score:  $Z_i^I = \frac{I_i - \langle I_i^{exp} \rangle}{\sigma(I_i^{exp})}$ . Высокое значение Z-score показывает позицию, в которой распределение аминокислот в значительной мере более связано с группировкой по специфичности, чем в среднем по всему выравниванию, и которая, вероятно, является специфической позицией (SDP). Учитывая серии Z-score, соответствующие каждой позиции множественного выравнивания, необходимо оценить значимость Z-score для того, чтобы определить является ли данное значение Z-score достаточно высоким, чтобы констатировать о специфичности данной позиции. Для этого программа SDPPred использует автоматическую процедуру установки порогов, основанную на вычислении оценки Бернулли (Kalinina et al., 2004).

Другой метод поиска специфичных замен был предложен Капрой и соавт. В программе GroupSim (Capra et al., 2008). Этот метод вместо подсчета частот встречаемости аминокислот в столбцах выравнивания использует оценку степени их взаимного сходства с учетом матрицы BLOSUM, отражающей как физико-химическое, так и эволюционное сходство аминокислот.

Так в работе Монторо с соавторами (Montoro et al., 2011) исследовалась специфика пальмитоилирования трансмембранного белка у *S.cerevisiae*, которая осуществляется преимущественно двумя белками Swf1 и Pfa4. С помощью сервиса GroupSim (Capra et al., 2008) были обнаружены аминокислотные остатки в данных белках, ответственные за специфическое связывание с субстратом. Экспериментальные данные подтвердили, что аминокислотные мутации в выявленных позициях значительно снижают степень связывания белков с субстратом (Montoro et al., 2011).

Одним из эффективных подходов к изучению адаптаций белковых структур к экстремальным условиям является сравнительный анализ последовательностей. Известен ряд примеров, когда в определенном

белковом семействе были обнаружены мутации специфичные к определенному параметру окружающей среды. Например, в работе Сорокиной с соавторами (Сорокина и др., 2013), исследовалось семейство липаз бактерий рода *Geobacillus*. В данной работе для изучения связи структура–термостабильность у липаз бактерий рода *Geobacillus* был использован консенсусный подход и количественный многофакторный анализ физико-химических свойств структурных мотивов с использованием программы WebProAnalyst (Ivanisenko *et al.*, 2005). Наиболее достоверное влияние на взаимосвязь структуры и термостабильности оказывал гидрофильный момент  $\alpha$ -спиралей. Таким образом, показано, что характер элементов вторичной структуры, а именно наличие  $\alpha$ -спиралей с определенными физико-химическими характеристиками, вносит существенный вклад в термостабильность белка. Для определения влияния отдельных мотивов, содержащих отдельные аминокислотные замены, на термостабильность липаз был проведен многофакторный дисперсионный анализ внутригрупповой корреляции физико-химических свойств выявленных мотивов. Показано, что все три выявленных консервативных района имеют высокий уровень корреляции между гидрофильным моментом  $\alpha$ -спирали и полярностью и зарядом остатков. Проведенное исследование позволило выявить два района согласованных замен у липаз бактерий рода *Geobacillus*, характерных для ферментов с большими временами полуинактивации. Данные замены также входят в структуру  $\alpha$ -спиралей, чей гидрофильный момент с высоким уровнем достоверности коррелирует с зарядом и полярностью входящих в нее аминокислотных остатков (Сорокина и др., 2013).

### **1.11. Заключение по обзору литературы и постановка задачи исследования**

В данном обзоре литературы были рассмотрены особенности существования организмов в экстремальных условиях обитания, в частности, при повышенных давлениях. Представлены основные факторы, обеспечивающие адаптацию организмов-пъезофилов к жизни в условиях высоких давлений. Было описано влияние повышенного давления на структуру и функционирование белков различных классов. Показано, что одним из основных факторов нарушения функций организмов в условиях повышенных давлений является нарушение структуры белков и их взаимодействий с другими молекулами (молекулярных комплексов). Показано, что основным фактором нарушения структуры и функции белка под воздействием повышенных давлений является изменение его взаимодействия с растворителем.

На основе анализа литературных данных проведено сравнение различных подходов моделирования поведения белковых макромолекул при повышенном давлении *in silico* с использованием метода молекулярной динамики. Был выбран оптимальный для осуществления в настоящей работе. Также приведено теоретическое обоснование метода молекулярной динамики.

Представленный обзор показывает важность изучения изменения структуры белка при повышенном давлении и актуальность использования при этом методов компьютерного моделирования.

На основе анализа результатов поиска белок-кодирующих генов, подверженных давлению отбора, для анализа методом молекулярной динамики по ряду структурных причин и в силу удобства моделирования был выбран белок Nip7 двух архей-экстремофилов *P.abysyi* и *P.furiosus* (Coltri *et al.*, 2007).

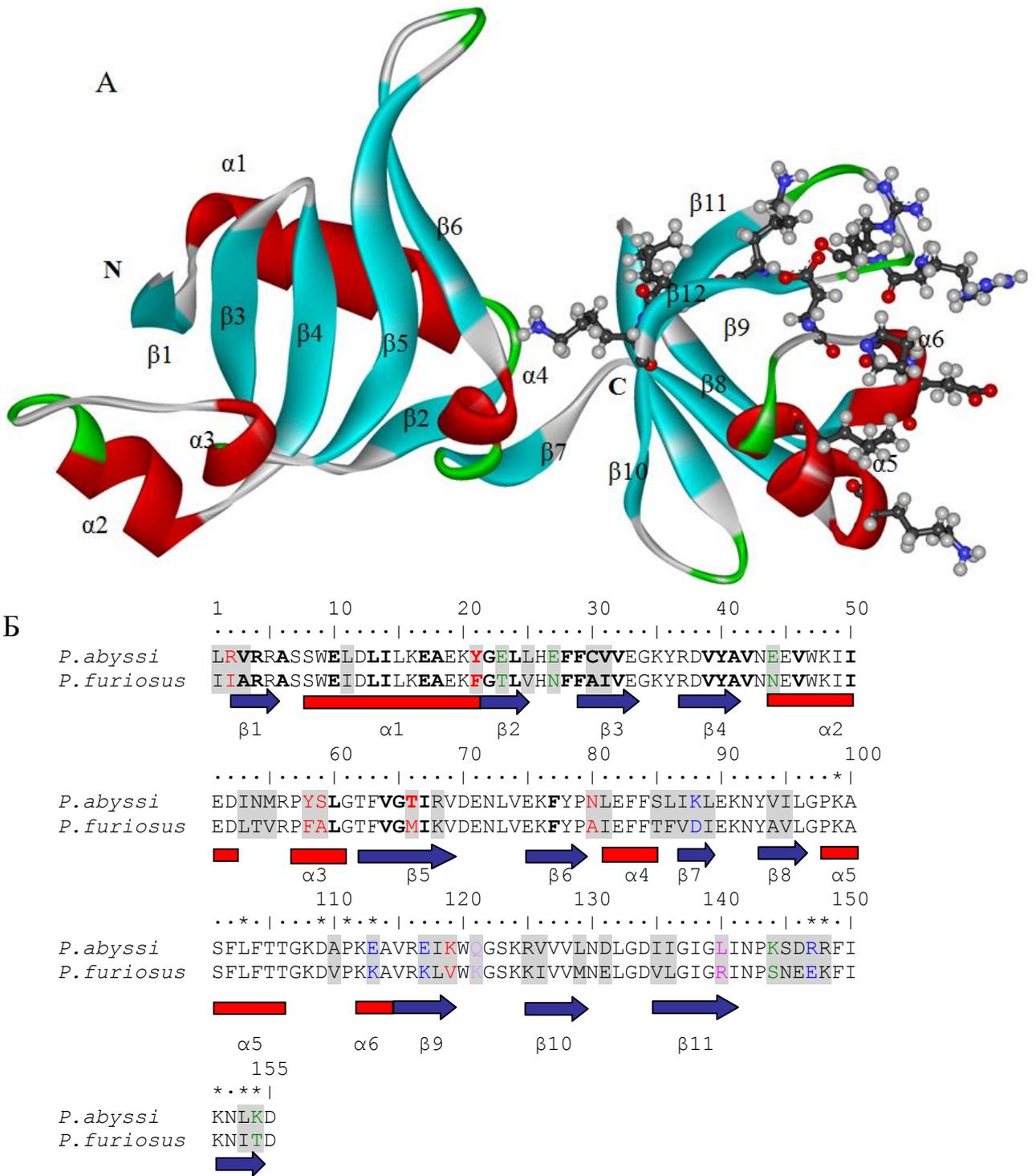
## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1. Модели белков

Модель белка Nip7 *P.abysssi* была взята из банка данных PDB (Berman *et al.*, 2000) , идентификационный номер 2P38 (Coltri *et al.*, 2007). Атомная модель белка Nip7 *P.abysssi* состоит из двух независимых мономеров и 252 молекул воды. Мономеры симметричны относительно друг друга, имеют ориентацию «голова к хвосту». Они формируют димер без каких-либо видимых структурных различий (значение RMSD  $C_{\alpha}$  атомов между двумя мономерами составляет 0.11 Å). Площадь поверхности контакта между мономерами составляет 700 Å<sup>2</sup> на молекулу или 8% от всей их поверхности. Эти расчеты предполагают, что димерная структура может быть результатом кристаллизации и в таком случае может быть биологически некорректна (Coltri *et al.*, 2007). Поэтому в настоящей работе белок 2P38:A рассматривается в качестве мономера. Первые четыре и последние семь аминокислотных остатков не присутствовали в экспериментальной модели и были исключены из эксперимента. В результате общая длина последовательности модели белка NIP7 *P.abysssi* составила 155 аминокислотных остатков. Данная модель была обозначена как NIP7-ABY, нумерация аминокислотных остатков приводится согласно их порядковым номерам в структуре (1VAL – 155ASP).

Модель NIP7 *P.furiosus* (NIP7-FUR), полученная методом реконструкции по гомологии, была взята из банка данных ModBase (Pieper *et al.*, 2011), ID Q8TZP7.

Выравнивание последовательностей NIP7 *P.abysssi* и *P.furiosus* не содержит делеций или вставок, что обеспечивает высокое качество модели NIP7-FUR. Число остатков в модели NIP7-FUR равно 155, их нумерация соответствует модели NIP7-ABY (1ILE-155ASP). Среднеквадратичное отклонение моделей NIP7-FUR и NIP7-ABY по координатам  $C_{\alpha}$  составило 0.1 Å.



**Рисунок 8.** Структура белка Nip7.

(А) Визуализация трехмерной структуры белка *P. abyssii* (2P38:A). Элементы вторичной структуры подписаны и окрашены соответствующим цветом ( $\alpha$ -спирали красным,  $\beta$ -листы синим, петли зеленым). N-терминальным домен изображен слева, C-терминальный справа. Аминокислоты участвующие с связывании РНК (Coltri *et al.*, 2007) изображены в виде шариков.

(Б) Выравнивание последовательностей белков *P. abyssii* и *P. furiousus*. Замены в белке *P. furiousus* относительно *P. abyssii* выделены серым цветом. Цветом выделены разные типы замен: замена полярного остатка у *P. abyssii* на

неполярный у *P. furiosus* (красным); заряженная аминокислота у *P. abyssi* на незаряженную у *P. furiosus* при сохранении полярности (зеленым); полярная аминокислота у *P. furiosus* на неполярную у *P. abyssi* (розовым); замена у *P. furiosus* заряженной боковой группы остатка на незаряженную (лиловым); смена знака заряда на противоположный (голубым). Вторичная структура схематично приведена под выравниванием:  $\alpha$ -спирали показаны красными прямоугольниками,  $\beta$ -листы синими стрелками. Символом \* указаны аминокислоты участвующие в связывании РНК (Coltri *et al.*, 2007).

В работе исследовалась молекулярная динамика белков при различных давлениях (0,1, 50, 100 МПа) и температурах (300 и 373 К). Для каждого набора параметров давления и температуры осуществлялось пять запусков молекулярной динамики. В результате было проведено 30 экспериментов для каждого белка. Всего 60 траекторий по 40 наносекунд. Затем значения структурных характеристик белков по пяти экспериментам при одних и тех же параметрах давления и температуры усреднялись. Ниже в тексте обозначения соответствующих экспериментов включают сокращенное название организма (aby/fur), величину давления и температуры. Например, для эксперимента модели NIP7-ABY при 50 МПа и 300 К траектория моделирования обозначается как *aby\_50\_300*, для эксперимента модели NIP7-FUR при 0,1 МПа и 373 К траектория моделирования обозначается как *fur\_01\_373* и т.д.

## 2.2. Подготовка моделей к моделированию молекулярной динамики

Моделирование методом молекулярной динамики пространственной структуры белка осуществлялось с помощью пакета программ GROMACS 4.5.3 (Van Der Spoel *et al.*, 2005). Для подготовки моделей использовали следующий алгоритм.

Вначале для каждой модели для устранения нежелательных напряжений проводилась минимизация энергии структуры в вакууме на протяжении 500 шагов. Этого времени было достаточно для того чтобы график энергии

вышел на «плато». Затем молекула белка помещалась в кубическую ячейку с ребром 20 нм с молекулами воды в модели SPCE. После чего в ячейку добавлялись ионы для нейтрализации заряда. Модель NIP7-ABY включала 2585 атомов белка, 32 900 молекул воды и 1 ион Cl<sup>-</sup>. Модель NIP7-FUR включала 2544 атома белка, 32 920 молекул воды и 2 иона Na<sup>+</sup>. Далее проводилась минимизация системы белок с растворителем в течение 2000 шагов. После минимизации энергии проводилось 2 варианта дальнейшей подготовки модели. В случае моделирования при 300К осуществлялись два подготовительных этапа моделирования при заданных значениях температуры и давления продолжительностью 200 пс каждый с постепенным снятием ограничений. В случае моделирования при 373К применялся следующий алгоритм. Начальная температура задавалась 300К и повышалась при каждом новом шаге моделирования на восемь градусов (с 300 до 308К, с 308 до 316К и так далее до 373К). Продолжительность каждого такого подготовительного моделирования составляла 50 пикосекунд. Всего было проведено девять подготовительных этапов по 50 пс, итого 450 пс. При этом давление в системе устанавливалось с начала моделирования. Только после всех вышеперечисленных подготовительных этапов осуществлялся запуск эксперимента продолжительностью 40 наносекунд. Все структурные характеристики белка исследовались в промежутке моделирования с 20 нс по 40 нс.

### 2.3. Моделирование молекулярной динамики

Моделирование молекулярной динамики проводилось с использованием алгоритма LINCS (Hess *et al.*, 1997) в силовом поле amber99sb-ildn (Berhanu *et al.*, 2012). Электростатические взаимодействия рассчитывались с помощью алгоритма Partial Mesh Ewald (PME). Время моделирования равнялось 40 наносекундам. Данные сохранялись каждые 100 пс.

## 2.4. Сравнение моделей и оценка подвижности полипептидной цепи

Отклонение структур от начальной структуры мы характеризовали среднеквадратичным отклонением координат  $C_\alpha$  атомов (RMSD) и площадью поверхности остатков доступной растворителю (SAS); параметры вторичной структуры, основанные на алгоритме DSSP (Kabsch *et al.*, 1983) были рассчитаны с помощью пакета программ GROMACS с использованием программ `g_rms`, `g_sas` и `do_dssp` соответственно.

Для того чтобы определить какие участки структуры белка подвержены наибольшим изменениям в результате воздействия давления и температуры, на основе выравнивания структур белков, мы рассчитывали для каждого остатка локальное отклонение структуры – RMSDL в скользящем окне длиной  $q+1$ :

$$RMSDL_i(\mathbf{v}, \mathbf{w}, q) = \sqrt{\left( \frac{1}{q} \sum_{j=i-q/2}^{j=i+q/2} (v_{jx} - w_{jx})^2 + (v_{jy} - w_{jy})^2 + (v_{jz} - w_{jz})^2 \right)},$$

где  $\mathbf{v}$ ,  $\mathbf{w}$  – аминокислотные последовательности,  $v$ ,  $w$  – конкретные аминокислотные остатки этих последовательностей,  $x$ ,  $y$ ,  $z$  – координаты каждого аминокислотного остатка,  $n$  – общее количество остатков,  $q$  – движущееся окно размером 11 аминокислотных остатков, что соответствует среднему устойчивому сегменту вторичной структуры белка.

Конформационная подвижность полипептидной цепи характеризовались значением среднеквадратичных флуктуаций  $C_\alpha$  атомов (RMSF), которое рассчитывалось в GROMACS с помощью программы `g_rmsf`.

## 2.5. Анализ вторичной структуры

Для того чтобы проанализировать устойчивость вторичной структуры в процессе моделирования, мы провели анализ трехмерных моделей белков с помощью программы DSSP (Kabsch *et al.*, 1983) на каждом этапе

моделирования. Сто трехмерных структур, полученных на последнем этапе моделирования молекулярной динамики подавались на вход программе DSSP. Последний этап моделирования от 20 до 40 нс был разделен на сто равных промежутков. И из финальной части каждого промежутка моделирования была извлечена структура белка, которая подавалась на вход программе DSSP. Полученный анализ вторичной структуры обрабатывался на предмет подсчета частот встречаемости определенного вида вторичной структуры в конкретной позиции. В общую вторичную структуру для данной траектории включался тип вторичной структуры остатка с наибольшей частотой встречаемости. Данная процедура проводилась для всех 60-ти траекторий.

Для вычисления вариабельности вторичной структуры в 30 траекториях для каждой из двух моделей был использован Protein Variability Server (Garcia-Boronat *et al.*, 2008).

## **2.6. Зависимость конформационных параметров моделей от температуры, давления и белковой последовательности**

Для того чтобы оценить влияние температуры, давления и аминокислотных замен на конформационные параметры белков мы использовали два типа дисперсионного анализа ANOVA (Kendall *et al.*, 1946).

Во-первых, для того чтобы учесть влияние температуры и давления на общие характеристики белковой глобулы, мы использовали двухфакторный дисперсионный анализ. Рассматривалось влияние двух факторов: температуры (300 и 373К) и давления (0.1, 50, 100 МПа) на какую-либо структурную характеристику белка,  $X$  (например,  $R_g$ , флуктуации глобулы, SAS). При каждом наборе параметров моделирования температуры и давления мы рассматривали средние значения этой характеристики по итогам анализа пяти запусков. Таким образом, анализировали таблицу

двухфакторного анализа с  $r=2$ ,  $c=3$ , одинаковым числом наблюдений в ячейках в сумме равных  $n=30$  ( $2 \cdot 3 \cdot 5$ ). Проверяли гипотезы о том, что средние значения по траекториям этих параметров не зависят от температуры и давления. Критические значения F-критерия устанавливались при  $\alpha=0,05$  для давления  $F(P) = 3.4$  ( $df=2$ ), для температуры  $F(T) = 4.26$  ( $df=1$ ), для взаимодействия этих факторов  $F(P \times T) = 3.4$  ( $df=24$ ).

Во-вторых, при анализе структурных характеристик аминокислотных остатков (RMSDL и RMSF) мы дополнительно оценивали влияния типа белка (NIP7-ABY, NIP7-FUR), рассматривая, таким образом, модель трехфакторного дисперсионного анализа с учетом температуры, давления и типа белка ( $r=2$ ,  $c=3$ ,  $l=2$ ;  $n=30$ ). Дополнительный фактор (тип белка) отражал влияние аминокислотных замен на средние значения RMSDL и RMSF для каждого из остатков. Следует отметить, что такой анализ не позволял ответить на вопрос, какие именно замены в белках повлияли на изменение конформационного параметра остатка. Критические значения F-критерия устанавливались при  $\alpha=0,05$  для давления  $F(P) = 3.4$  ( $df=2$ ), для температуры  $F(T) = 4.26$  ( $df=1$ ), для взаимодействия этих факторов  $F(P \times T) = 3.4$  ( $df=24$ ).

Для того чтобы определить степень влияния повышенной температуры на конформационные параметры белка, был введен индекс чувствительности  $S^t$ . Для этого были рассчитаны средние значения конформационного параметра  $X$  для траекторий при высокой ( $X_{T=373}$ ) и низкой ( $X_{T=300}$ ) температуре. Индекс чувствительности рассчитывался следующим образом:  $S^t = \frac{X_{T=373}}{X_{T=300}}$ . Если значение  $S^t$  близко к единице это означает, что высокая температура не имеет значительного влияния на данный конформационный параметр по сравнению с его значением при низкой температуре. Значение  $S^t$  большее единицы означает, что повышенная температура увеличивает значение структурного параметра по сравнению с его значением при низкой температуре. Значение  $S^t$  меньше

единицы означает, что повышение температуры снижает значение структурного параметра. Рассматривалось несколько структурных параметров:  $RMSDL_i$ , локальные среднеквадратичные отклонения полипептидной цепи для  $i$ -го остатка,  $RMSF_i$ , среднеквадратичные флуктуации  $i$ -го остатка, и наличие солевых мостиков.

Кроме того, была оценена чувствительность структурных параметров к повышению давления  $S^p$ . Были определены значения параметров траекторий при повышенных давлениях (50 и 100 МПа),  $X_{P-high}$ , и атмосферном давлении (0.1 МПа),  $X_{P-low}$ . Индекс чувствительности к давлению рассчитывался следующим образом:  $S^p = \frac{X_{P-high}}{X_{P-low}}$ .

## 2.7. Анализ солевых мостиков

Солевые мостики – это динамические структуры в белке, связь которых может возникать и разрушаться под действием каких-либо внешних факторов среды. Для определения наличия солевого мостика был использован критерий, согласно которому расстояние между двумя противоположно заряженными атомами не должно превышать 4 Å (Barlow *et al.*, 1983). Для каждого солевого мостика определялось его персистентность – доля структур в области равновесия траекторий (20-40 нс) для которых выполнялся критерий Barlow *et al.* В английском языке аналогом понятия «персистентность солевых мостиков» является понятие «salt bridge persistence».

Зависимость персистентности солевых мостиков от температуры и давления мы оценивали при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (см. выше).

## 2.8. Визуализация трехмерных структур

Для визуализации моделей структур использовалась программа Accelrys Discovery Studio Visualizer (<http://accelrys.com/products/discovery-studio/>).

## **2.9. Статистический анализ**

Статистическая обработка данных была проведена с помощью программ Excel и Statistica 6.0.

## **2.10. Предсказание сайтов белок-белковых взаимодействий**

Для предсказания сайтов белок-белковых взаимодействий использовался сервер SPPIDER (<http://sppider.cchmc.org/>) (Porollo *et al.*, 2007)

## **2.11. Поиск и выравнивание гомологичных белков архей**

Для обнаружения замен специфичных к температуре и давлению с помощью программы PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997) была составлена выборка гомологов Nip7 архей, включавшая 35 белков. При поиске мы учитывали только те гомологичные последовательности, длина которых не превышала 200 аминокислот и была не менее 120 аминокислот, аннотация которых соответствовала функциям белка Nip7 (белки, принимающие участие в функционировании рибосомы).

Последовательности были выравнены с использованием программы PROMALS3D (Pei *et al.*, 2008), в качестве структурного шаблона для выравнивания использовалась модель белка Nip7 *P. abyssi* (Coltri *et al.*, 2007; PDB ID 2P38:A).

Полученная выборка была разделена по каждому из двух экологических признаков организмов (глубина и температура местообитаний) на две подгруппы: а) мелководные (глубина менее 1000 м) и глубоководные

организмы (глубина более 1000 м), б) мезофильные (температура ниже 45°C) и термофильные организмы (температура выше 45°C).

Поиск аминокислотных замен в позициях выравнивания, специфичных по отношению к температуре и глубинам местообитаний проводился независимым образом. Это позволило оценить влияние двух факторов на адаптацию белков.

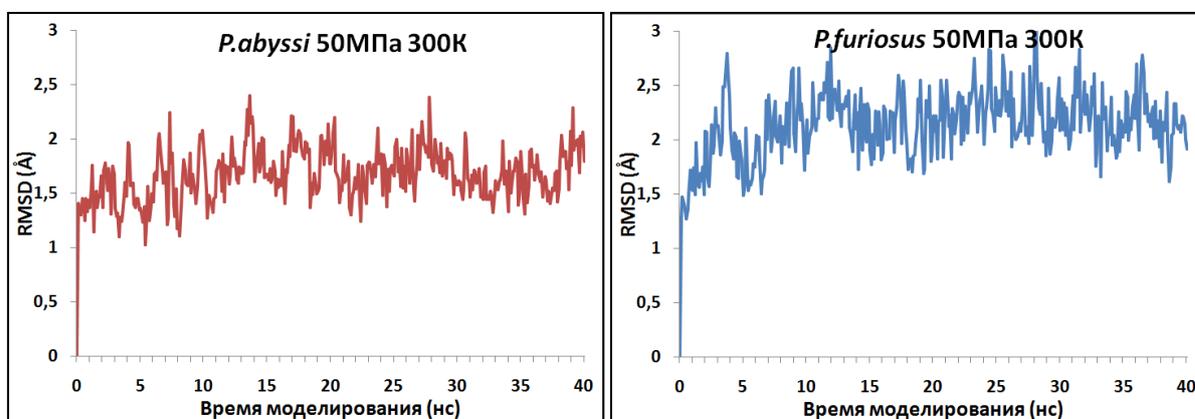
Мы использовали для идентификации специфичных замен две программы, multi-Harmony (Pirovano *et al.*, 2006) и GroupSim (Capra *et al.*, 2008). При использовании программы multi-Harmony считалось, что замены в позиции являются специфическими по отношению к температуре/глубине, если значение веса, рассчитанного этой программой, было меньше -3 (как рекомендовано авторами) Кроме веса программа multi-Harmony для каждой из групп последовательностей выдает консенсус позиции. Консенсус это строка, содержащая типы аминокислот в однобуквенной кодировке, ранжированных по частоте встречаемости в группе. В консенсусе ранг указывается порядком аминокислоты в строке в направлении слева направо. Если частота встречаемости какого-либо типа остатка вполовину меньше чем наиболее часто встречающийся тип остатка, символ указывается строчной буквой. Например, консенсус “LVits” означает, что в позиции выравнивания в группе последовательностей содержатся аминокислоты LEU, VAL, ILE, TRE, SER, частота их встречаемости убывает в порядке перечисления, а частота ILE, TRE, SER составляет менее 1/2 от частоты встречаемости LEU.

Вторая программа, GroupSim, оценивает сходство аминокислот внутри и между разными группами организмов на основе матрицы BLOSUM62 и выдает для каждой позиции вес, значение которого выше 0.7 свидетельствует о наличии специфических замен в позиции выравнивания (этот порог рекомендован авторами программы). Мы считали, что замены в позиции выравнивания ассоциированы с изменением температуры/глубины если такая связь была значимо идентифицирована обеими программами.

## Глава 3. Молекулярное моделирование белковых структур Nip7 глубоководного и мелководного организмов

### 3.1. Стабильность моделей белков

На рисунке 9 продемонстрировано изменение значения среднеквадратичного отклонения  $C_{\alpha}$  атомов белка относительно начальной структуры в процессе моделирования молекулярной динамики для траекторий при 50 МПа. Видно, что примерно к 20 нс структуры уравниваются. Значение порядка  $2\text{\AA}$  свидетельствует о том, что структуры стабильны при всех параметрах моделирования. Средние значения RMSD в экспериментах выше при температуре 373 К, чем при 300 К при одних и тех же параметрах давления.



**Рисунок 9.** Зависимость значения RMSD  $C_{\alpha}$  атомов относительно начальной структуры моделирования молекулярной динамики при 50 МПа и 300К. Графики для зависимости значения RMSD  $C_{\alpha}$  атомов относительно начальной структуры для всех экспериментов приведены в Приложении №1.

Мы провели сравнение структур двух белков в процессе моделирования с кристаллографической структурой белка Nip7 (2P38:A) *P. abyssi*. В Таблице 2 приведены средние значения RMSD и доверительные

интервалы с вероятностью 95% для траекторий при различных значениях температуры и давления.

**Таблица 2.** Сравнение значений RMSD  $C_{\alpha}$  атомов двух моделей белков NIP7-ABY и NIP7-FUR относительно кристаллографической структуры *P. abyssi* Nip7 (2P38:A).

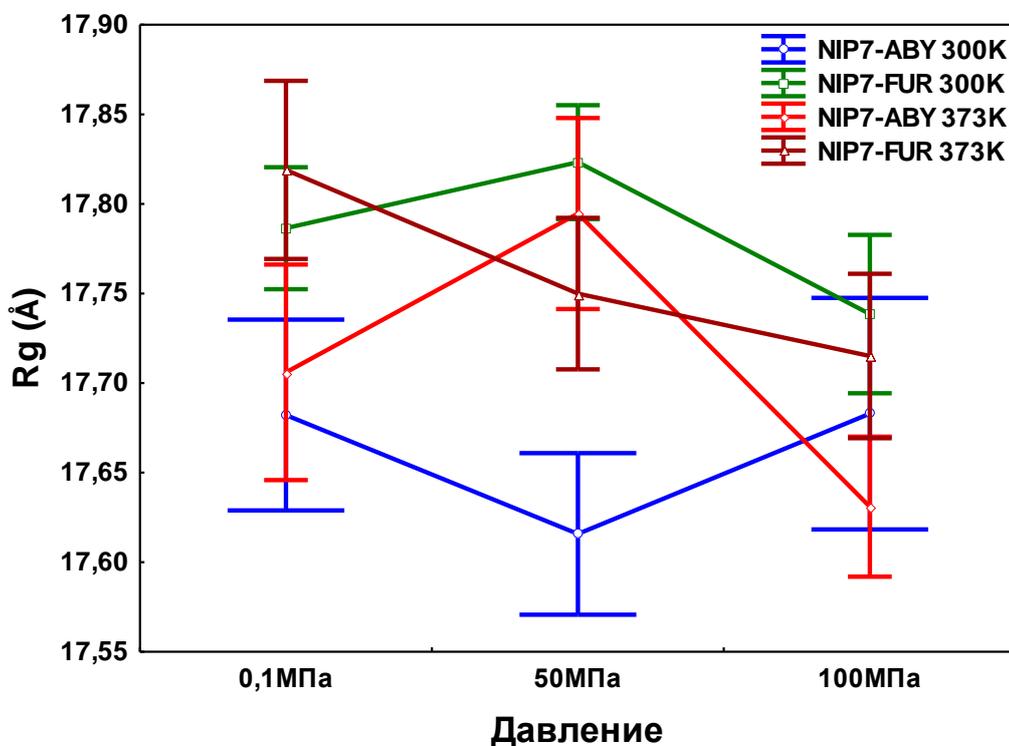
Средние значения приведены с доверительными интервалами с вероятностью 95% при различных значениях давления и температуры.

Модель	NIP7-ABY		NIP7-FUR	
	Температура 300 К	Температура 373 К	Температура 300 К	Температура 373 К
0.1	1.76 ± 0.04	1.93 ± 0.04	2.08 ± 0.03	2.41 ± 0.02
50	1.81 ± 0.04	1.94 ± 0.06	2.2 ± 0.05	2.2 ± 0.03
100	1.79 ± 0.06	1.78 ± 0.03	2.18 ± 0.02	2.23 ± 0.02

Как видно из Таблицы 2, отклонения полипептидной цепи моделей от кристаллографической структуры увеличиваются с повышением температуры и давления, однако, среднее значение RMSD не превышает 2.4 Å, это свидетельствует о том, что структуры стабильны в течение моделирования при всех параметрах исследования. Значения RMSD также увеличиваются при повышении температуры. Кроме того, у модели NIP7-FUR наблюдаются большие отклонения, чем у NIP7-ABY при всех значениях давления и температуры. Таблица демонстрирует также, что при увеличении температуры наблюдается тенденция увеличения RMSD для двух белков.

Радиус гирации ( $R_g$ ) это ещё один показатель стабильности структуры в процессе моделирования. Радиус гирации объекта описывает его размеры, и рассчитывается как среднеквадратичное расстояние между его центром тяжести и границами объекта. Применительно к белкам радиус гирации показывает степень компактизации белковой молекулы, то есть насколько плотно свёрнута белковая цепь. На Рисунке 10 показано сравнение средних значений  $R_g$  белковых структур для траекторий при разных давлениях и

температурах. Детальный анализ показал, что значения радиуса гирации ведут себя немонотонно при различных температурах в обеих моделях. У NIP7-ABY при  $T=300$  К значение  $R_g$  сначала незначительно снижается при давлении 50 МПа, а затем возрастает при 100 МПа. У модели NIP7-ABY при высокой температуре значения  $R_g$  ведут себя в точности наоборот. Что касается модели NIP7-FUR, ее  $R_g$  растёт при давлении 50 МПа при температуре 300 К, затем показывает медленное снижение при 100 МПа. Различия в значениях  $R_g$  для траекторий при высокой и комнатной температурах находятся в пределах стандартной ошибки.



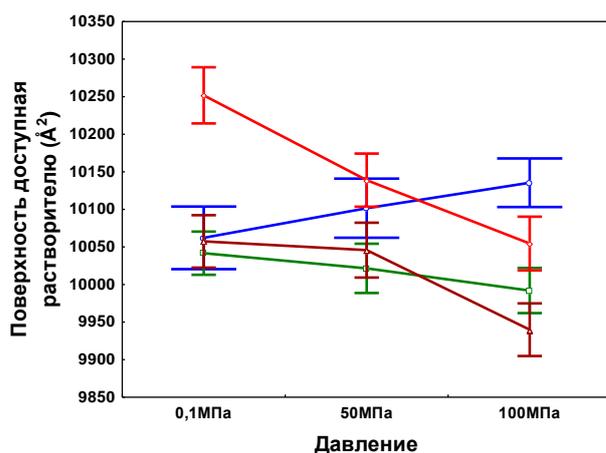
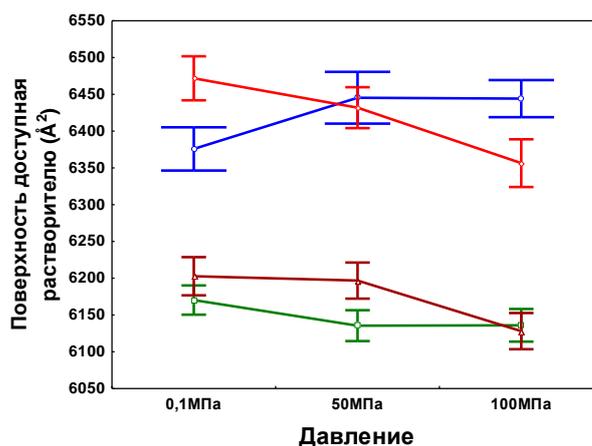
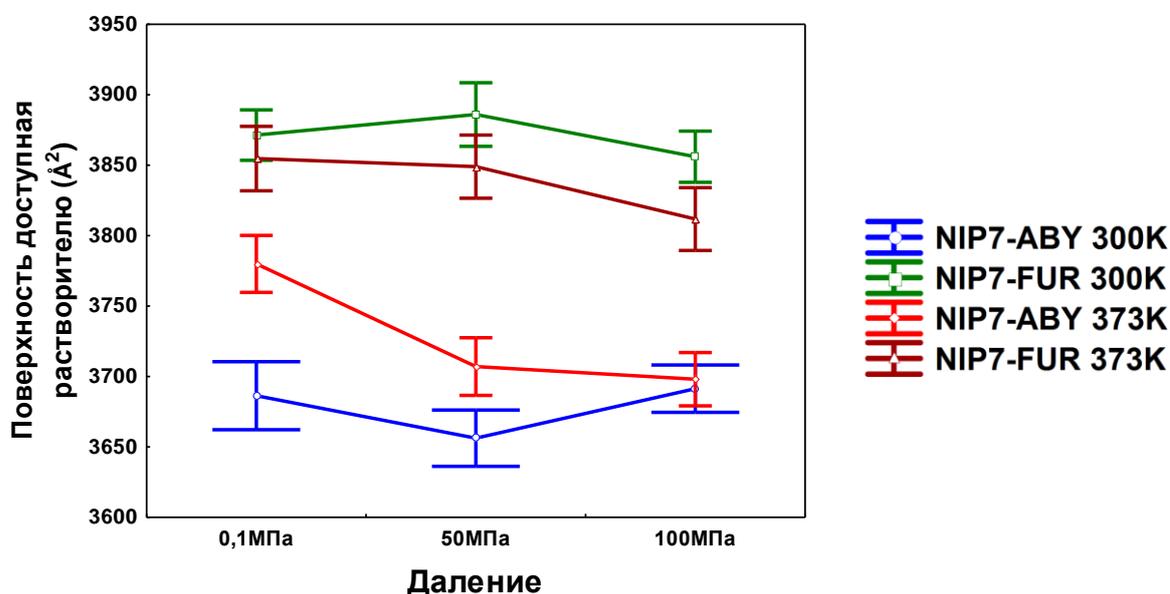
**Рисунок 10.** Зависимость значения радиуса гирации ( $R_g$ , ось Y) от давления (ось X) при высокой и низкой температурах для двух моделей белка Nip7 NIP7-ABY и NIP7-FUR. Вертикальными линиями показаны 95% доверительные интервалы.

Стоит отметить, что, в общем, значение  $R_g$  глубоководного организма NIP7-ABY меньше, то есть этот белок имеет более плотную упаковку, чем её мелководных гомолог при давлении 0,1 МПа и 100 МПа при любом значении температуры. Более плотная упаковка глубоководного белка необходима для нормального функционирования молекулы при высоких

давлениях. С другой стороны, менее плотная упаковка модели NIP7-FUR, может быть обусловлена тем, что для нее использовалось моделирование по гомологии, а не данные кристаллографии. Двухфакторный анализ величин  $R_g$  для двух моделей показал, что изменения давления и температуры не приводят к значимым изменениям средних значений  $R_g$  для двух исследованных нами моделей белков (Приложение №2). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что высокие давления и температуры оказывают комплексное влияние на исследуемые модели белка Nip7.

### 3.2. Взаимодействие с растворителем

Для каждой траектории двух моделей белков мы рассчитали доступность остатков растворителю для всего белка ( $SAS_t$ ), также отдельно полярную ( $SAS_p$ ) и гидрофобную ( $SAS_h$ ) части поверхности. Мы также оценили флуктуации данных параметров в процессе моделирования. На Рисунке 11 (А-В) мы сравнили параметры  $SAS_t$ ,  $SAS_p$ , и  $SAS_h$  полученные для различных траекторий. Как видно из Рисунка 11А, относительная разница в полной площади поверхности двух белков находится в пределах стандартной ошибки (модель NIP7-ABY при 373 К является исключением). Этот факт согласуется с разницей в значениях радиуса гирации, приведённой выше. Общая площадь поверхности несколько меньше у NIP7-FUR.  $SAS_t$  имеет тенденцию к снижению с увеличением давления (модель NIP7-ABY при 300 К является исключением).

А SAS<sub>t</sub>Б SAS<sub>p</sub>В SAS<sub>h</sub>

**Рисунок 11.** Графики зависимости площади поверхности белка доступной растворителю от различных условий моделирования молекулярной динамики: (А) общая поверхность белка доступная растворителю; (Б) полярная часть; (В) гидрофобная часть. Давление отложено вдоль оси X, параметр SAS вдоль оси Y. Вертикальными линиями показаны 95% доверительные интервалы.

Из Рисунка 11Б видно, что для модели NIP7-ABY наблюдаются более высокие значения полярной доли остатков, доступных растворителю, чем для модели NIP7-FUR. Площадь гидрофобной части поверхности для этой модели меньше. Эти различия наблюдаются для всех исследованных нами параметров температуры и давления.

Для модели NIP7-FUR можно отметить следующие тренды в значениях параметров SAS: (1) повышение температуры повышает доступность растворителю полярной части белка (за исключением давлений 100 МПа) и уменьшает площадь гидрофобной части поверхности, при этом общая площадь изменяется слабо; (2) повышение давления систематически уменьшает значения SAS. Однако большинство этих изменений находится в пределах стандартных ошибок среднего.

Для модели NIP7-ABY поведение параметров SAS не однозначно. При увеличении температуры наблюдается явный тренд к понижению величин SAS трех типов при повышении давления. При  $T=300$  К такой тренд отсутствует и в некоторых случаях значения SAS даже возрастают, хотя и в пределах стандартных отклонений. Для этой модели характерно значимое повышение SAS всех типов при увеличении температуры и атмосферном давлении и значимое понижение параметров  $SAS_p$  и  $SAS_t$  при увеличении температуры и высоком давлении (100 МПа).  $SAS_h$  для модели NIP7-ABY при низкой температуре практически не зависит от давления. При давлениях 0,1 и 50 МПа повышение температуры существенно увеличивает  $SAS_h$ , при давлении 100 МПа эти значения для низкотемпературных и высокотемпературных траекторий практически не отличаются.

Мы оценили влияние температуры и давления на изменение площади поверхностей моделей на основе двухфакторного дисперсионного анализа (Приложение №3). Полученные данные в целом согласуются с анализом по Рисунку 11. Температура значимо влияет на изменение гидрофобной части площади поверхности модели NIP7-ABY, при этом показано, что влияние давления и температуры на изменение полной площади поверхности белка не является аддитивным. Это, по-видимому, отражает различие в значениях SAS для высоко- и низкотемпературных траекторий NIP7-ABY. Для модели NIP7-FUR показано, что давление значимо влияет на изменения как гидрофильной части площади, так и  $SAS_t$ .

Таким образом, давление и температура по разному влияют на изменение доступности остатков растворителю для двух моделей белков. Давление приводит к уменьшению площади поверхности, доступной растворителю. Это наиболее выражено для моделей при высоких температурах.

### 3.3. Локальная структура полипептидной цепи

На следующем этапе исследования мы определяли то, как различные участки полипептидной отклоняются от кристаллографической структуры белка Nip7 в процессе моделирования. Для разных траекторий были построены графики отражающие зависимость параметра локального структурного отклонения (RMSDL) от от номера аминокислотного остатка. Мы также оценили среднюю ошибку RMSDL, которая характеризует флуктуации каждого остатка в процессе моделирования (Приложение №4, Рисунок 4.1). Графики демонстрируют неоднородность локальных изменений полипептидной цепи в процессе моделирования. В структуре белка наблюдаются районы, в которых отклонения достаточно малы ( $\sim 1\text{\AA}$ ), в то время как в других районах изменения в локальной конформации цепи относительно кристаллографической структуры значительны ( $\sim 3,5\text{-}4\text{\AA}$ ). В таких случаях значения RMSDL полипептидной цепи больше в тех регионах, которые соответствуют петлям соединяющим элементы вторичной структуры. Области с большим значением RMSDL, как правило, расположены в тех местах, где аминокислотные замены встречаются часто. В результате, эволюционно и структурно переменные районы фактически совпадают (за исключением позиций 85-100, которые соответствуют участку между спиралями  $\alpha_4\text{-}\alpha_5$  (Приложение №4, Рисунок 4.1). Для этого участка значение RMSDL низкое, тогда как количество различий между последовательностями белка Nip7 *P.abyssii* и *P.furiosus* велико.

Другие особенности заключаются в различиях значений RMSDL между N- и C-терминальным доменами. В N-терминальном домене присутствуют

районы с низким значением RMSDL и пики в областях петель (позиции 30-40, которые соответствуют петле  $\beta_3$ - $\beta_4$ , позиции 49-59 и 69-79). Графики структурных изменений С-терминального PUA домена, также содержат максимальные значения в позициях 115-125, 143-148 (Приложение №4, Рисунок 4.1) и минимальные, однако, минимальные значения существенно выше таковых в N-терминальном домене. Таким образом, значения RMSDL выше для С-терминального домена, по сравнению с N-терминальным. При сравнении графиков RMSD для различных траекторий, видно, что повышенные значения RMSDL характерны для одних и тех же участков полипептидной цепи при всех значениях температуры и давления (Приложение №4, Рисунок 4.1). Это означает, что локальные изменения в конформации белковой цепи в наших моделях происходят в одних и тех же районах структуры (преимущественно в петлях), несмотря на различную природу дестабилизирующих факторов (изменение температуры или давления) и различия в первичной структуре.

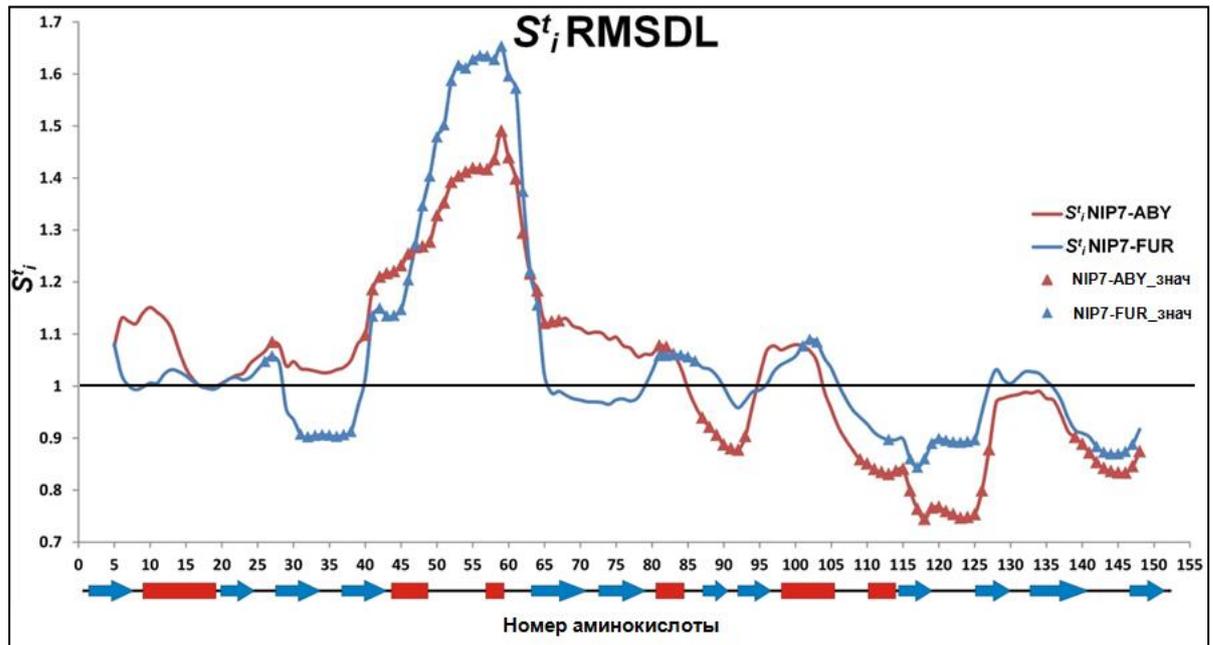
Рассмотрим эффект влияния давления и температуры на конформационные изменения полипептидной цепи моделей белка Nip7. Анализ графиков RMSDL остатков при разных температурах и давлениях (Приложение №4, Рисунок 4.1) показывает, что при одном и том же давлении повышение температуры приводит к увеличению значения RMSDL для некоторых аминокислотных остатков. Изменения значений RMSDL полипептидной цепи в результате повышения температуры происходят неравномерно. Например, увеличение RMSDL при повышении температуры наблюдается для модели NIP7-ABY в области петли  $\alpha_2$ - $\alpha_3$  (позиции 49-59). Наоборот, для областей с небольшим RMSDL у этой модели повышение температуры приводит лишь к незначительному увеличению значения, например, как на участке  $\beta_4$ - $\beta_5$ . Подобный эффект для этой модели наблюдается для низких, средних и высоких давлений (Приложение №4, Рисунок 4.1). Это также справедливо для модели мелководного белка NIP7-FUR при высоких давлениях. Однако, изменения

RMSDL при повышении температуры и давлении 0.1 МПа для модели NIP7-FUR по сравнению с экспериментом при высоких давлениях крайне незначительны. Таким образом, хотя у моделей NIP7-ABY и NIP7-FUR наблюдается ряд общих особенностей, они отличаются по структурным изменениям, вызываемым повышением давления и температуры.

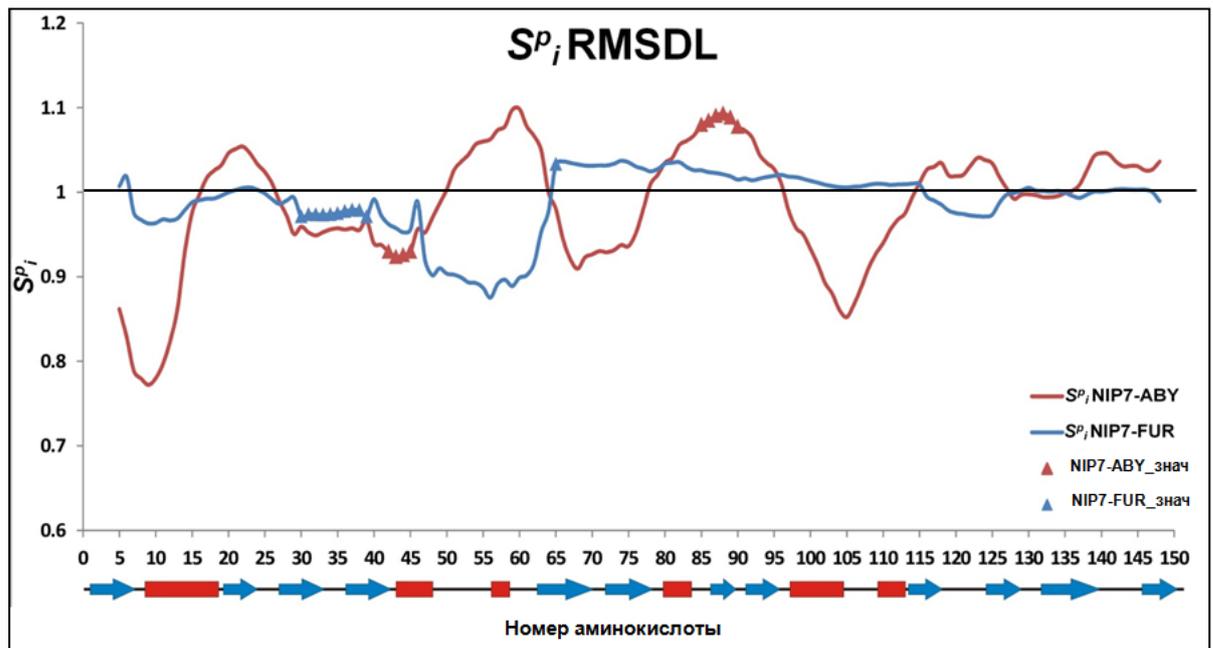
Интересной особенностью, полученной при сравнении двух белков, является значение RMSDL С-терминального домена модели NIP7-FUR, которое выше, чем у модели NIP7-ABY при любых значениях давления и температуры (Приложение №4, Рисунок 4.1). Эти различия меньше при низких температурах и наиболее выражены для траекторий при высоких давлениях и температурах. Тем не менее, для С-терминального домена модели NIP7-ABY, при высоких давлениях траектории показывают заметно меньшее значение RMSDL при 373 К, чем при комнатной температуре.

Для того чтобы более подробно исследовать локальные структурные изменения белка, мы провели анализ чувствительности значения RMSDL каждого аминокислотного остатка к увеличению давления ( $S^p_i$ ), температуры ( $S^t_i$ ) и совместного изменения этих двух параметров (см. Материалы и Методы). Чем больше значение  $S_i$ , тем более значимые отклонения сегмента полипептидной цепи с центром в аминокислоте  $i$  относительно кристаллографической структуры белка Nip7 происходят при повышении температуры (давления). Значимость различий между RMSDL в зависимости от температуры и давления оценивалась нами по результатам двухфакторного дисперсионного анализа (см. Материалы и Методы). Влияние температуры и давления на значение параметра RMSDL считалось значимым, если соответствующее значение  $F$ -статистики было выше порогового значения при  $\alpha=0.05$  (Приложение №5). Результаты представлены на Рисунке 12.

А



Б



**Рисунок 12.** Графики зависимости индекса чувствительности RMSDL к увеличению температуры и давления от номера аминокислотного остатка.

(А) Линии и маркеры отражают зависимость индекса чувствительности RMSDL ( $S_i^t$ ) к увеличению температуры от номера аминокислотного остатка для NIP7-ABY (красный цвет) NIP7-FUR (синий цвет) по результатам двухфакторного дисперсионного анализа. Ось X – номер аминокислотного остатка; ось Y – значения параметра  $S_i^t$ .

(Б) Линии и маркеры отражают зависимость индекса чувствительности RMSDL ( $S_i^p$ ) к увеличению давления от номера аминокислотного остатка для NIP7-ABY (красный цвет) NIP7-FUR (синий цвет) по результатам

двухфакторного дисперсионного анализа. Ось X – номер аминокислотного остатка; ось Y – значения параметра  $S_i^p$ .

Из Рисунка 12А видно, что температурная чувствительность параметра RMSDL двух белков различается, будучи зависимой от позиции аминокислотных остатков. Во-первых, существуют участки белка, для которых температура значимо увеличивает RMSDL ( $S_i^t > 1$ ) для двух моделей. К таким районам относится, прежде всего, большой сегмент последовательности от С-терминальной части нити  $\beta_4$  до N-терминального конца нити  $\beta_5$  (позиции 41-65). *F*-статистика для большинства его остатков в несколько раз превышает 5% критическое значение для обеих моделей (Приложение №5). На графиках, приведенных в Приложении №4 (Рисунок 4.1), этот район соответствует пикам значений RMSDL, которые увеличиваются при повышении температуры. Небольшое, но значимое увеличение RMSDL зафиксировано в N-терминальном домене для обеих моделей в позициях 26-27 (N-терминальный конец  $\beta_3$ ). Для модели NIP7-FUR также характерно значимое уменьшение RMSDL остатков в позициях 31-37 ( $\beta_3$ -  $\beta_4$ ) под воздействием высокой температуры. Высокие значения параметра  $S_i^t$  наблюдаются для N-терминальных остатков обеих моделей, однако влияние температуры на изменение RMSDL для этих остатков оказалось не значимым.

Интересная картина наблюдается для С-терминального домена. Подавляющая часть его остатков имеет значения  $S_i^t < 1$ , для многих из них эти отличия значимы. Это означает, что повышение температуры делает конформацию С-терминального домена в большей степени похожей на конформацию кристаллографической структуры. Наиболее существенны эти изменения для участка 109-127 ( $\alpha_6$  -  $\beta_{10}$ ). При этом меньшие значения  $S_i^t$  характерны для модели NIP7-ABY. Другой участок, который также подвержен изменению конформации при повышении температуры в двух моделях, соединяет два домена белка (позиции 80-93). Значимое

уменьшение RMSDL характерно и для С- терминальных остатков в обеих моделях.

Чувствительность параметра RMSDL к увеличению давления показана на Рисунке 12Б. Доля позиций, для которых изменения  $S_i^p$  значимы существенно меньше для обеих моделей, чем в случае с  $S_i^t$ . Для модели NIP7-FUR существенные изменения характерны для N-терминального домена (прежде всего, позиции 30-38), в отличие от С-терминального. Для модели NIP7-ABY колебания значений  $S_i^p$  вдоль последовательности более выражены, однако значимыми являются изменения в позициях 41-44 (уменьшение RMSDL) и 85-89 (увеличение RMSDL).

### 3.4. Анализ вторичной структуры белка

Для того чтобы более подробно описать локальные конформационные изменения полипептидной цепи, мы проанализировали вторичную структуру моделей белка Nip7 для разных параметров моделирования. На Рисунке 13 отображены наиболее часто встречающихся состояний вторичной структуры остатков по данным анализа траекторий, рассчитанных при одних и тех же условиях моделирования. Из рисунка видно, что вторичная структура обеих моделей является устойчивой и слабо меняется при изменении условий моделирования для подавляющего большинства аминокислотных остатков.

Более того, для ряда участков белка, имеющих высокие значения RMSDL, т.е. конформация которых отлична от кристаллографической, вторичная структура остается неизменной.

Например, значения RMSDL для петли 69-79 (район  $\beta_5$ - $\beta_6$ ) достаточно высоки (Приложение №4, Рисунок 4.1), вторичная структура этого фрагмента изменяется лишь незначительно при влиянии повышенных давления и температуры. Это предполагает, что эта  $\beta$ -шпилька изменяет свою конформацию без разрушения водородных связей, а только путём изгиба или поворота.



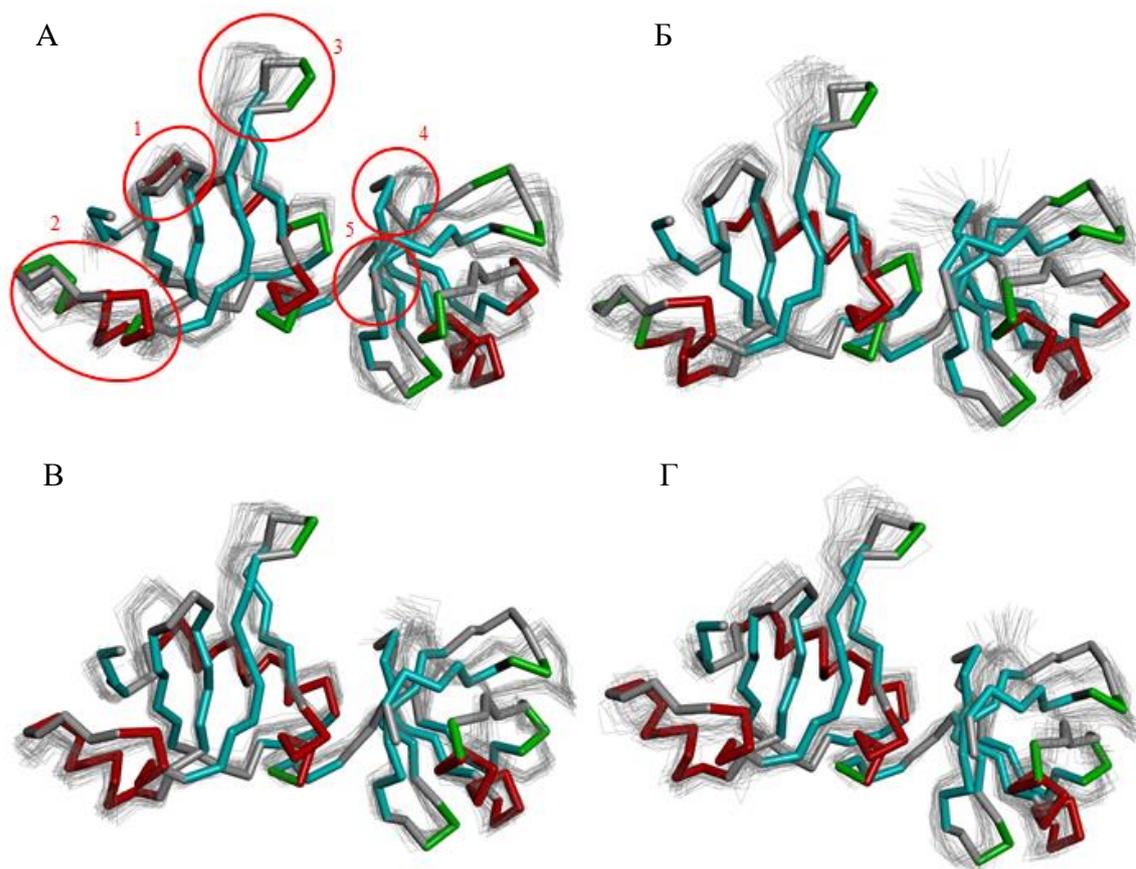
Анализ данных по изменению вторичной структуры белка (Рисунок 13) показал, что часть её элементов нестабильна при изменении давления и температуры. Это характеристики терминальных остатков альфа-спиралей и петли сформированной остатками 48-60 (участок  $\alpha_2$ - $\alpha_3$ ). При разных давлениях и температурах конформация этих остатков варьируется между состояниями  $\alpha$ -спирали (H), поворотом (T), и петлёй (S). Таким образом, этот сегмент белка демонстрирует повышенную конформационную изменчивость. Конформационные перестройки в районе  $\alpha_2$ - $\alpha_3$  могут происходить в результате высокой степени скручивания основной цепи. В этом районе на С-конце короткой  $\alpha_3$ -спирали наблюдается резкий поворот, затем идёт один виток спирали, который переходит в лист  $\beta_5$  (Рисунок 8А). Позиции N- и С-терминальных остатков этого фрагмента фиксированы глобулой N-терминального домена. Дополнительными факторами дестабилизации конформации данного района являются чередования полярных и гидрофобных остатков (позиции 46, 49, 53, 55), которые в результате конформационных изменений основной цепи фрагмента  $\alpha_2$ - $\alpha_3$  могут взаимодействовать с растворителем.

Интересно отметить также изменения вторичной структуры белка в позициях 80-86,  $\alpha_4$ -спирали (Рисунок 13) в N-терминальном домене для обеих моделей. В кристаллографических структурах эта область принимает конформацию  $\alpha$ -спирали, тогда как в траекториях вторичная структура данного района представлена спиралью  $3_{10}$ . В С-терминальном домене также можно выделить участки, характеризующиеся непостоянством вторичной структуры. Это, прежде всего, петли, соединяющие  $\beta$ -листы (позиции 143-149,  $\beta_{11}$ - $\beta_{12}$ ). В этих регионах наблюдаются конформационные переходы от петель к поворотам, для них характерны также высокие значения параметра RMSDL (Приложение №4, Рисунок 4.1).

Описанные выше конформационные изменения подтверждаются сравнением трехмерных структур моделей для разных наборов параметра моделирования (Приложение №4, Рисунок 4.2). Из рисунков видно, что

остатки 69-75, которые принадлежат к  $\beta$ -повороту, имеют стабильную вторичную структуру, и в то же время, высокую конформационную подвижность, которая характеризуется высокими значениями RMSDL. В процессе моделирования эти остатки смещаются по направлению центральной части N-терминального домена. Такие конформационные изменения при сохранении вторичной структуры соответствуют скручиванию  $\beta$ -листа, степень которого зависит от давления и температуры. Схожие конформационные изменения (смещение к центру N-терминального домена без значительных нарушений вторичной структуры) также наблюдается для петли между листами  $\beta_3$ - $\beta_4$ , для которой характерны высокие значения RMSDL (Приложение №4, Рисунок 4.1). Кроме того, на рис. 14 хорошо заметны конформационные изменения в районе 45-55, связанные с нарушением спиральной конформации (см. также рис. 12) и в петлях между  $\beta$ -листами терминальных доменов.

Сравнение панелей рис. 14 (А-Г) наглядно демонстрирует увеличение флуктуаций остатков 120-125 и 153-155 на С-конце белка NIP-ABY. Также заметно увеличение флуктуаций структуры всего белка с повышением температуры (NIP7-ABY, NIP7-FUR).



**Рисунок 14.** Изображения множественного выравнивания траекторий моделей белка с кристаллографической структурой белка Nip7 *P.abysssi*.

(А) NIP7-ABY при 300К и 100 МПа; (Б) NIP7-ABY при 373К и 100 МПа; (В) NIP7-FUR при 300К и 100 МПа; (Г) NIP7-FUR при 373К и 100 МПа.

Кристаллографическая структура белка Nip7 *P.abysssi* окрашена по типу вторичной структуры: бета листы - синим; альфа-спирали - красным; петли - зеленым. Модели полученные с помощью моделирования молекулярной динамики показаны серым цветом. Красными овалами отмечены наиболее подвижные районы: (1) петля  $\beta_3$ - $\beta_4$  (остатки 29-41), (2) район  $\alpha_2$ - $\alpha_3$  (остатки 44-61); (3) петля  $\beta_5$ - $\beta_6$  (остатки 62-79); (4) петля  $\beta_9$ - $\beta_{10}$  (остатки 120-125); (5) С-терминальные остатки (153-155).

### 3.5. Флуктуации полипептидной цепи

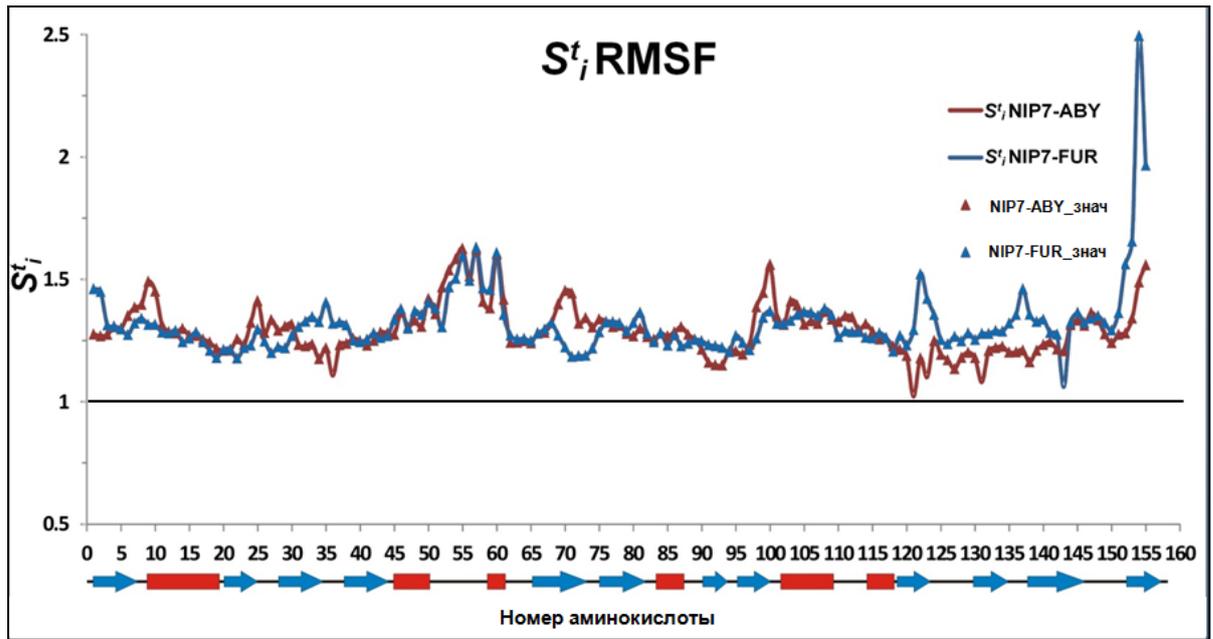
Для оценки конформационной подвижности аминокислотных остатков в процессе моделирования мы использовали оценки флуктуаций полипептидной цепи (RMSF). Результаты анализа приведены в приложении №4 (Рисунок 4.3). На графиках отражена зависимость значения

среднеквадратичных флуктуаций  $S_a$  атомов белка от номера аминокислотного остатка (Приложение №4, Рисунок 4.3).

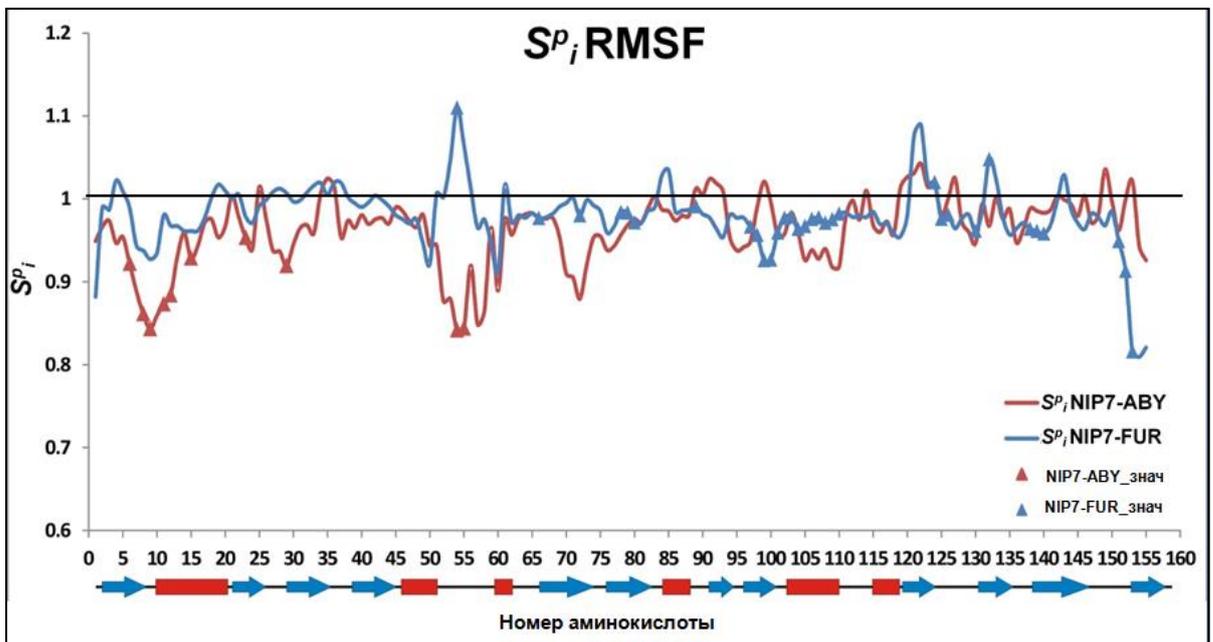
Анализ данных позволяет выделить участки полипептидной цепи, в которых флуктуации повышены. Это преимущественно петли: в позициях 31-41 (петля  $\beta_3$ - $\beta_4$ ), 50 – 60 (район  $\alpha_3$ ), 69-79 (район  $\beta_5$ - $\beta_6$ ), 98-102 (район  $\beta_8$ - $\alpha_5$ ), 120-125 (район  $\beta_9$ - $\beta_{10}$ ), 140-150 (петля  $\beta_{11}$ - $\beta_{12}$ ). Интересно, что сравнение графиков RMSF и RMSDL для аминокислотных остатков показывает, что районы локальных максимумов этих параметров часто совпадают. Другими особенностями являются высокие значения RMSF остатков на N- и C-концах белков, которые больше при высокой температуре (373 К) (Приложение №4, Рисунок 4.3).

Чувствительность значения RMSF к повышению температуры и давления была проанализирована для каждого аминокислотного остатка таким же образом, как и для параметра RMSDL. Результаты представлены на Рисунке 15. Анализ профилей чувствительности к температуре показал, что повышение температуры увеличивает значение локальных полипептидных флуктуаций. Для обеих моделей значение  $S_i^t$  значительно больше единицы для подавляющего числа аминокислот, что свидетельствует о систематическом повышении флуктуаций полипептидной цепи при повышении температуры. Однако на графике наблюдаются участки, чувствительность которых к повышению температуры мала, а для некоторых остатков даже незначима (для NIP7-ABY это остатки 36, 121, 123, 131; для NIP7-FUR это остаток в позиции 146). Это остатки в петлях имеют высокие значения RMSF уже при температуре 300К, а увеличение температуры не приводит к какому-либо существенному увеличению их подвижности.

А



Б



**Рисунок 15.** Графики зависимости индекса чувствительности RMSF к увеличению температуры и давления от номера аминокислотного остатка. (А) Линии и маркеры отражают зависимость индекса чувствительности RMSF ( $S_i^t$ ) к увеличению температуры от номера аминокислотного остатка для NIP7-ABY (красный цвет) NIP7-FUR (синий цвет) по результатам двухфакторного дисперсионного анализа. Ось X – номер аминокислотного остатка; ось Y – значения параметра  $S_i^t$ . (Б) Линии и маркеры отражают зависимость индекса чувствительности RMSF ( $S_i^p$ ) к увеличению давления от номера аминокислотного остатка для

NIP7-ABY (красный цвет) NIP7-FUR (синий цвет) по результатам двухфакторного дисперсионного анализа. Ось X – номер аминокислотного остатка; ось Y – значения параметра  $S_i^p$ .

При увеличении давления результаты для моделей белка Nip7 мелководного и глубоководного организмов отличаются (Рисунок 15Б). Параметр  $S_i^p$  больше единицы только для небольшого числа остатков. Для N-терминального домена уменьшение флуктуаций для модели NIP7-ABY при воздействии давления выражено больше, чем для NIP7-FUR. В этом домене для ряда остатков давление значимо влияет на изменение RMSF. Это остатки, расположенные в позициях 6-15 (N-терминальная часть спирали  $\alpha_1$ ), позиции 23, 29 (петля между  $\beta_2$  и  $\beta_3$ ) и 54-55 (петля  $\alpha_2 - \alpha_3$ ).

Для модели белка NIP7-FUR значимое влияние повышенного давления на значение RMSF наблюдалось для остатков в основном из C-терминальной области белка (позиции 97-110, спираль  $\alpha_5$ ). Это наиболее чувствительный регион к увеличению давления, для которого  $S_i^p < 1$ . Некоторые другие остатки, для которых значение RMSF значимо снижается с увеличением давления, расположены в области  $\beta_{10}$  (позиции 125-130),  $\beta_{11}$  (138-140),  $\beta_{12}$  (152-153) и в позиции 89. Некоторые позиции демонстрируют значимое снижение RMSF под влиянием давления в N-терминальном домене (66, 72, 78-80). Однако модели белков содержат остатки, для которых значение RMSF увеличивается с увеличением давления. Остатки, для которых такое увеличение статистически значимо, наблюдаются только для модели NIP7-FUR (54, 124, 132). Интересно отметить, что только одна позиция демонстрирует значимую зависимость её значения RMSF от давления в обеих моделях – позиция 54, расположенная в петле  $\alpha_2 - \alpha_3$ . При этом в модели NIP7-ABY давление уменьшает флуктуации этого остатка, а в модели NIP7-FUR – увеличивает.

Для того чтобы исследовать влияние давления и температуры на флуктуации моделей, как в целом, так и на каждый из доменов по отдельности, мы провели двухфакторный дисперсионный анализ при

разных температурах. Сравнивались средние значения RMSF  $C_{\alpha}$  атомов для отдельных доменов в моделях NIP7-ABY и NIP7-FUR в разных траекториях (Приложение №6). Статистический анализ показал, что для модели NIP7-ABY при температуре 300К изменение давления не влияет значимо на флуктуации N- и C-терминального домена. Однако, различия во флуктуациях между доменами доменов значимы: C-терминальный домен демонстрирует большие флуктуации по сравнению с N-терминальным доменом. При высокой температуре влияние давления на параметр RMSF двух доменов становится значимым. Флуктуации обоих доменов снижаются при повышении давления. Различия во флуктуациях между двумя доменами при высокой температуре остается такой же, как при 300К: для C-терминального домена значения RMSF выше.

Для модели NIP7-FUR наблюдается значимое влияние давления на величину параметра RMSF обоих доменов при низком давлении и высокой температуре (Приложение №6). Флуктуации обоих доменов снижаются с увеличением давления, как и в модели NIP7-ABY. Различия в значениях RMSF были значимы при температуре 300 и 373К.

### 3.6. Анализ солевых мостиков

Кристаллическая структура белка Nip7 *P. abyssi* содержит восемь пар аминокислотных остатков, формирующих солевые мостики согласно критерию Барлоу и Торнтон (Barlow *et al.*, 1983). Для каждого возможного солевого мостика была оценена доля структур, где данный мостик был сформирован (персистентность). Это было сделано для всех рассматриваемых траекторий и моделей. Анализ моделей NIP7-ABY и NIP7-FUR показал, что существуют стабильные солевые мостики (присутствующие в среднем в 70% структур в разных траекториях обоих белков), умеренно стабильные (присутствие 20-70%) и нестабильные солевые мостики присутствующие меньше чем в 20% структур (Таблицы 4 и 5, Приложение №7). Необходимо отметить, что для некоторых боковых

групп, способных формировать солевые мостики, не все атомы представлены в кристаллической структуре 2P38:A. Например, аминокислоты GLU51, LYS76 представлены не полностью. В настоящей работе были реконструированы недостающие атомы боковых групп этих остатков для того, чтобы учесть их при анализе солевых мостиков.

Шесть солевых мостиков (GLU10-ARG4, GLU75-ARG37, ARG37-GLU10, LYS20-GLU17, ARG148-ASP109, GLU33-ARG4) являются наиболее стабильными (Таблица 3). Они образуются более чем в 70% структур в моделях NIP7-ABY и NIP7-FUR. Пары GLU33-ARG4 и GLU131-ARG116 (пропущенные в кристаллической структуре 2P38:A) могут быть отнесены к наиболее консервативным в модели NIP7-FUR. Четыре стабильных солевых мостика, расположенных в N-терминальном домене (GLU10-ARG4, GLU75-ARG37, ARG37-GLU10, GLU33-ARG4) формируют сеть, соединяющую альфа-спираль с бета-листами. Оставшиеся солевые мостики могут быть отнесены к умеренно стабильным. Число стабильных и умеренно стабильных мостиков больше у модели NIP7-ABY (20), чем у NIP7-FUR (13). Также были обнаружены два солевых мостика, которые являются умеренно стабильными в модели NIP7-FUR и нестабильными в модели NIP7-ABY (146-112, 76-17).

Анализ функциональной роли наиболее стабильных солевых мостиков показал (Таблица 3), что большинство из них стабилизируют упаковку элементов вторичной структуры белка. Однако ряд солевых мостиков в наших моделях формируются остатками, для которых показано, что они взаимодействуют с РНК (Coltri *et al.*, 2007). В таблице они отмечены в столбце «Расположение». Для модели NIP7-ABY среди стабильных мостиков таких пар четыре, для модели NIP7-FUR только один солевой мостик (148-109) сформирован парой остатков, оба из которых участвуют во взаимодействии с РНК, остальные солевые мостики либо отсутствуют в модели NIP7-FUR, либо являются нестабильными.

**Таблица 3.**

Чувствительность наиболее стабильных солевых мостиков в моделях NIP7-ABY и NIP7-FUR повышению температуры и давления.

Первая колонка – номер аминокислот, формирующих солевой мостик; вторая колонка – наличие солевых мостиков в разных структурах (ALL: модели NIP7-ABY, NIP7-FUR и кристаллографическая структура 2P38:A; ABY & FUR: только для моделей NIP7-ABY, NIP7-FUR и т.д.); третья колонка – указание расположение солевого мостика в структуре белка; колонки 4-11 – значения индексов чувствительности для моделей NIP7-ABY и NIP7-FUR.  $F$  – значение  $F$ -критерия для конкретного параметра по результатам двухфакторного дисперсионного анализа. Значимые значения выделены жирным шрифтом. Нестабильные солевые мостики (процент встречаемости менее 20%) отмечены символом – н.

Мостик	Наличие	Расположение	<i>P.abysssi</i>				<i>P.furiosus</i>			
			$S^T$	$F(T)$	$S^P$	$F(P)$	$S^T$	$F(T)$	$S^P$	$F(P)$
10-4	все	$\alpha_1 - \alpha_1$	0,94	2,74	1,04	0,83	0,99	1	1,01	1
75-37	все	$\beta_6 - \beta_4$	1,06	0,52	1,11	0,91	0,99	1,89	1,00	0,36
37-10	все	$\beta_4 - \alpha_1$	1,04	0,16	1,14	0,99	1,18	2,87	0,88	<b>4,68</b>
148-109	все	РНК связывающий - РНК связывающий	0,95	0,40	1,09	0,45	н	н	н	н
33-4	все	$\beta_3 - \beta_1$	0,92	0,59	0,94	0,69	0,98	0,10	1,00	0,20
20-17	все	$\alpha_1 - \alpha_1$	0,92	2,65	1,02	0,13	0,89	2,96	0,98	0,36
16-12	P.a.&P.f.	$\alpha_1 - \alpha_1$	1,14	3,77	0,91	1,68	1,08	1,60	0,89	2,76
147-113	P.a.&P.f.	РНК связывающий - РНК связывающий; $\alpha_6$	0,98	0,02	0,72	3,18	н	н	н	н
33-2	2p38&P.a.	$\beta_3$ - N-конец	0,98	0,01	0,99	2,07	-	-	-	-
131-116	все	C-конец - $\beta_9$	1,93	<b>12,23</b>	0,94	0,49	0,98	0,72	0,99	0,43
51-5	P.a.&P.f.	$\alpha_2 - \beta_1$	1,25	1,50	1,03	0,03	0,88	1,11	1,18	0,74
76-70	P.a.&P.f.	$\beta_6$ - N-конец	1,20	<b>6,59</b>	0,84	<b>3,42</b>	0,83	<b>8,19</b>	0,95	1,98
147-146	P.a.	РНК связывающий - C- конец	1,84	4,12	0,95	0,12	-	-	-	-
48-45	P.a.&P.f.	$\alpha_2 - \alpha_2$	1,06	0,14	0,92	1,42	0,99	0,00	0,88	1,29
88-23	P.a.	$\beta_7 - \beta_2$	1,26	<b>5,91</b>	0,87	1,72	-	-	-	-
151-109	все	РНК связывающий; $\beta_{12}$ - РНК связывающий	0,93	0,09	0,75	1,49	0,86	2,74	0,92	0,42
119-117	P.a.	$\beta_9 - \beta_9$	0,98	0,04	1,26	2,31	-	-	-	-
48-44	2p38&P.a.	$\alpha_2 - \alpha_2$	0,99	0,00	0,98	0,01	-	-	-	-
146-112	все	C-конец - $\alpha_5$	н	н	н	н	1,01	0,00	1,11	0,50
76-17	P.a.&P.f.	$\beta_6 - \alpha_1$	н	н	н	н	0,83	1,07	0,95	0,56

Как высокая температура и давление могут влиять на формирование солевых мостиков в двух разных моделях белка? Для того чтобы ответить на этот вопрос, мы рассчитали для каждого солевого мостика параметр чувствительности к давлению ( $S^P$ ) и температуре ( $S^T$ ) так же как это было сделано для параметров RMSDL и RMSF (Материалы и методы). Чем выше

значение этих показателей, тем больше вероятность мостика при повышении температуры или давления. Для оценки значимости влияния давления и температуры на персистентность солевого мостика мы использовали двухфакторный дисперсионный анализ, в результате которого были получены значения статистик  $F(T)$ ,  $F(P)$  (см материалы и методы). Мы предположили, что высокая температура или давление влияет на персистентность солевого мостика, если соответствующее значение  $F(T)/F(P)$ -статистики превышает 0,05 порог значимости. Результаты для стабильных и умеренно стабильных солевых мостиков для обеих моделей представлены в Таблице 3. Они демонстрируют, что для модели NIP7-ABY 3 из 20 стабильных солевых (17%) повержены влиянию высокой температуры (131-116, 76-70 и 88-23). Два солевых мостика значимо подвержены влиянию температуры (148-109 и 76-70), оба они также стабилизируются при высокой температуре. При этом первый из них сформирован остатками, участвующими в связывании РНК, а второй также стабилизируется при высоких температурах у NIP7-ABY. Для обеих моделей существуют также солевые мостики, чувствительность которых к температуре существенно отклоняется от 1, но не значима ( $S^t < 0.8$  или  $S^t > 1.2$ ). Большинство из них при повышении температуры стабилизируются, и только по одному солевому мостику у каждой модели дестабилизируются (146-112 у NIP7-ABY и 76-17 у NIP7-FUR). Отметим, что эти солевые мостики одни из наиболее нестабильных. Таким образом, повышение температуры для ряда солевых мостиков в наших моделях изменяет их персистентность, преимущественно в сторону увеличения.

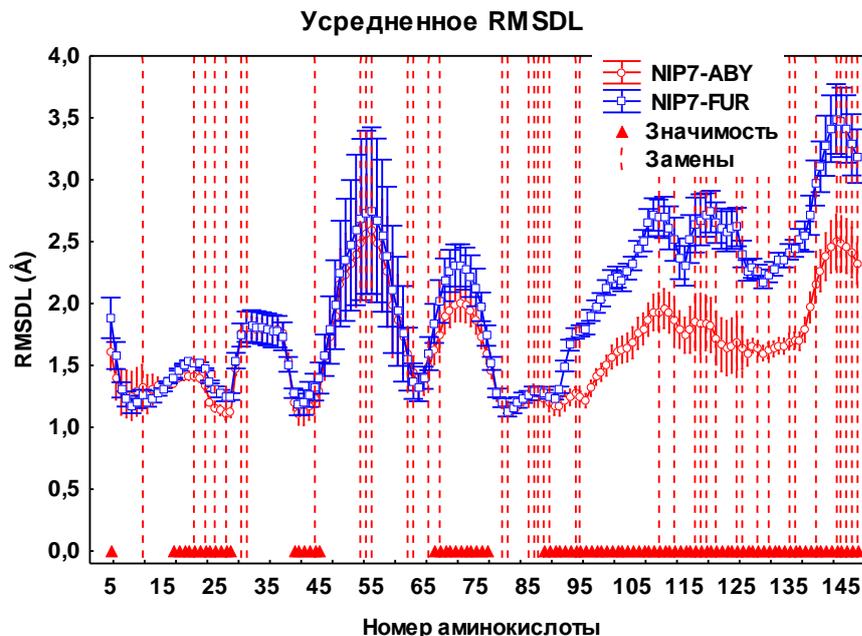
Если рассмотреть более подробно персистентность солевых мостиков, можно обнаружить некоторые интересные детали. Мостик 131-116, на стабильность которого для глубоководного белка значимо влияет температура, выглядит как ASP131-ARG116 для модели NIP7-ABY. В случае мелководного белка в 131 позиции происходит замена аспарагиновой кислоты на глутаминовую и значимого влияния температуры

в модели NIP7-FUR уже не наблюдается. Мостик 148-109, на стабильность которого для мелководного белка значимо влияет температура, выглядит как LYS148-ASP109 для модели NIP7-FUR. В случае глубоководного белка в 148 позиции происходит замена лизина на аргинин, и значимого влияния температуры в модели NIP7-ABY уже не наблюдается.

### 3.7. Влияние типа белка на динамику белковой структуры

Для того чтобы оценить влияние замен аминокислот на структурные свойства белка NIP7 в сравнении с такими факторами как температура и давление, мы провели трехфакторный дисперсионный анализ для каждого из аминокислотных остатков. Результаты приведены в Приложении №8.

Анализ влияния температуры на RMSDL двух моделей показывает, что локальная структура значимо отклоняется от кристаллографической, 2P38:A для 77 из 143 проанализированных нами позиций (53%). Давление оказывает значимое влияние на RMSDL только для 9 позиций белка (6%). В тоже время тип белка значимо влияет на конформационные отклонения полипептидной цепи для 91 позиции (63%), Рисунок 16.

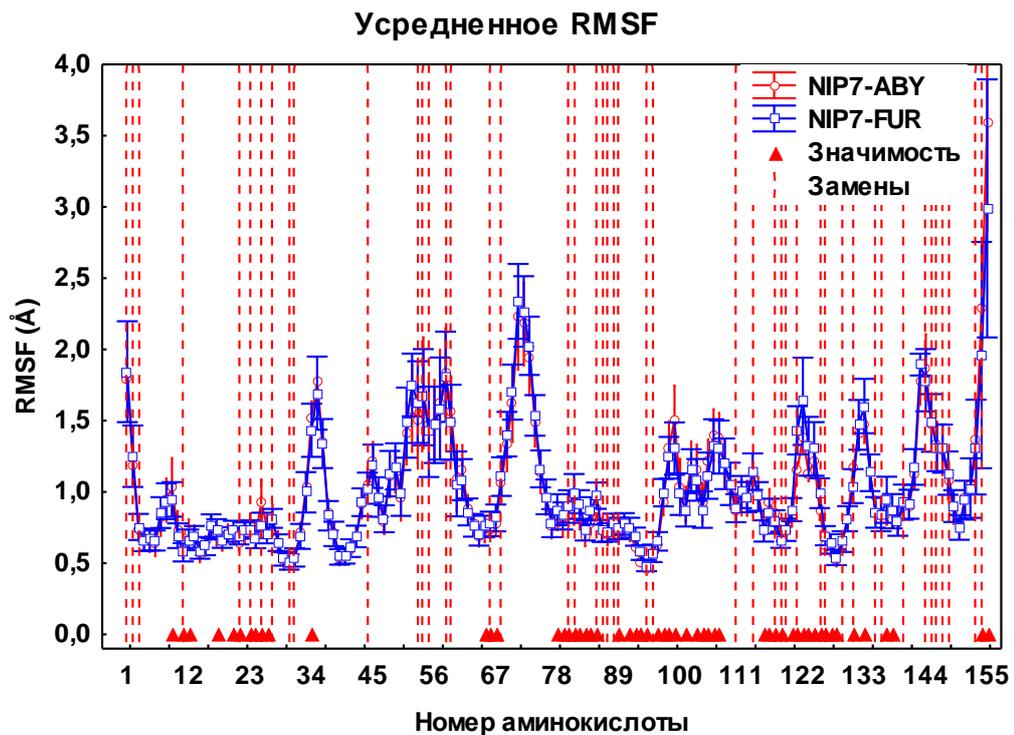


**Рисунок 16.** Значения RMSDL для белков NIP7-ABY и NIP7-FUR усредненные по всем траекториям и запускам. Красные треугольники показывают позиции, в которых параметр RMSDL значимо зависит от типа модели белка по результатам трехфакторного дисперсионного анализа.

Красные пунктирные линии – позиции замен в NIP7-ABY относительно NIP7-FUR.

При этом наиболее характерные различия наблюдаются для С-терминального домена белка (Рисунок 16). Кроме того, значимые различия в параметре RMSDL в зависимости от типа модели наблюдаются для участков 16-28, 40-45, 67-77 и позиции 5. Видно, что для этих участков отклонения от конформации кристаллографической структуры у модели NIP7-FUR выше, чем у модели NIP7-ABY.

Аналогичный анализ мы провели для параметров RMSF аминокислотных остатков (Приложение №8). Результаты показали, что повышение температуры значимо влияет на увеличение RMSF для всех без исключения аминокислотных остатков белка NIP7. Давление значимо влияет на изменение RMSF у 26 аминокислотных остатков (16%). Тип модели влияет на изменение флуктуаций для 56 (36%) аминокислотных остатков.



**Рисунок 17.** Значения RMSF для белков NIP7-ABY и NIP7-FUR усредненные по всем траекториям и запускам. Оранжевые точки показывают позиции, в которых параметр RMSF значимо зависит от типа модели белка по результатам трехфакторного дисперсионного анализа.

Красные пунктирные линии – позиции замен в NIP7-ABY относительно NIP7-FUR.

Значимые различия между значениями RMSF для остатков из двух моделей наблюдались как в случае, когда флуктуации были выше для модели NIP7-ABY, так и, наоборот, для NIP7-FUR (Рисунок 17). К первой группе относятся остатки в позициях N- терминального домена (9, 11, 12, 17, 20, 21, 23, 24-26), соответствующих спирали  $\alpha_1$  и нити  $\beta_2$ , а также в позиции 34 (петля между  $\beta_3$  и  $\beta_4$ ), а также C- терминального домена (96-107, 115-118, 154-155). Ко второй группе относятся позиции 65-67, 78-85, 89, 120-128, 131-133.

### **3.8. Эффект влияния температуры и давления на структуру и динамику белка Nip7**

В данной главе были описаны результаты анализа серии моделирований молекулярной динамики белков Nip7 двух видов представителей морских архей - глубоководного *P.abyssii* и мелководного *P.furiosus* в диапазоне давлений 0.1, 50, 100 МПа и значениях температуры 300 и 373 К. Была исследована структура данных белков при различных условиях.

Отличительная характеристика рассматриваемых моделей – их стабильность в течение всего периода моделирования (40 нс). Они остаются стабильны как при повышении давления, так и при повышении температуры. Значения RMSD относительно кристаллографической структуры (2P38:A) в среднем меньше для модели NIP7-ABY, чем для NIP7-FUR. Вторичная структура моделей изменяется незначительно, что свидетельствует, что отличия в структурах двух белков связаны с изменением конформаций петель и взаимного расположения элементов вторичной структуры. Расчёты локальных среднеквадратичных отклонений (RMSDL) полипептидной цепи, вторичной структуры и

среднеквадратичных флуктуаций (RMSF) демонстрируют различные уровни вариабельности и флуктуаций структуры в процессе моделирования. Наибольшее значение RMSDL относительно кристаллографической структуры наблюдается в петлях, связывающих элементы вторичной структуры, например, такие участки цепи, как 30-40, 49-59 и 69-79 в N-терминальном домене. Также это участки 105-110, 115-125 и 143-148 в C-терминальном домене и остатки на N- и C- концах полипептидной цепи. Отклонения N-терминального домена от кристаллографической структуры меньше, чем C-терминального.

Воздействие высокой температуры для двух белков приводит с одной стороны к изменению равновесных конформаций полипептидной цепи (что видно при сравнении профилей RMSDL на Рисунке 12), с другой стороны, к увеличению ее флуктуаций.

Конформационные изменения при повышении температуры связаны с уменьшением структурных отклонений в C-терминальном домене от кристаллографической структуры, в том числе и в позициях, которые формируют взаимодействия с РНК. В N-терминальном домене отклонения увеличивались в районе спиралей  $\alpha_2$ - $\alpha_3$ . Отметим, что влияние температуры на изменение конформации белка наблюдалось в экспериментах по молекулярной динамике и ранее. Например, для NADH оксидазы организма *Thermus thermophilus* (Merkley *et al.*, 2012) конформационные изменения при повышении температуры наблюдались в районе активного центра белка.

Сравнение моделей белка полученных при температуре 373 и 300 К показывает, что при повышении температуры флуктуации полипептидной цепи увеличиваются, хотя общая топология белковой структуры сохраняется. Районы, подверженные увеличению флуктуаций – преимущественно петли и терминальные участки белка. Как и в случае с RMSDL, наиболее подверженным увеличению RMSF среди внутренних участков цепи оказался участок  $\alpha_2$ - $\alpha_3$ . Необходимо отметить, что подобный

эффект высоких температур на конформацию полипептидной цепи является характеристикой моделей белка, подверженных влиянию высокой температуры (Martinez *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Priyakumar *et al.*, 2010; Tiberti *et al.*, 2011).

Эффекты влияния повышенного давления на структуру белка достаточно разнообразны. Во-первых, при повышенных давлениях уменьшается радиус гирации. Это означает, что конформация белка становится более компактной, однако эти изменения находятся в пределах стандартной ошибки. Структурные отклонения модели белка NIP7-ABY от кристаллографической структуры при высокой температуре снижаются с увеличением давления. Этот тренд также наблюдается для модели NIP7-FUR (Таблица 2). Увеличение давления приводит также к снижению площади доступной растворителю. Это уменьшение характерно для модели NIP7-FUR, для которой влияние давления на величины SAS является значимым (Приложение №3). Значимое уменьшение площади поверхности, доступной растворителю наблюдается и для модели NIP7-ABY, однако лишь при высокой температуре. Таким образом, увеличение давления делает структуру NIP7 более компактной, что наиболее выражено при высокой температуре.

Во-вторых, повышение давления приводит к структурным перестройкам в белковой глобуле. Таким образом, для модели NIP7-ABY увеличение давления приводит к уменьшению локальных отклонений белка относительно кристаллографической структуры, особенно это хорошо видно в С-терминальном домене (Приложение №4, Рисунок 4.1). Это находится в полном согласии с результатами Calandrini (Calandrini *et al.*, 2008), которые пришли к выводу, что давление влияет на более медленные колебания структуры, которые подразумевают перестановки в белковой глобуле. Однако этот эффект компактизации под давлением менее выражен для модели NIP7-FUR (Рисунок 12).

Уменьшение флуктуаций полипептидной цепи – это ещё один эффект, который мы наблюдали с увеличением давления. Этот эффект наблюдается как на уровне доменов (Приложение №9), так и на уровне аминокислот (Рисунок 15Б). Среднее значение RMSF в траекториях при высоком давлении ниже, чем при атмосферном давлении и одинаковой температуре. Давление значимо увеличивает флуктуации доменов, за исключением модели NIP7-ABY при 300К.

Моделирование молекулярной динамики белковых структур под влиянием высоких давлений дало множество доказательств снижения флуктуаций полипептидной цепи в результате воздействия давления (Carrese *et al.*, 2009; McCarthy *et al.*, 2006; Laurent *et al.*, 2012). Полученные данные демонстрируют, что если белковая глобула не денатурирует, давление может стабилизировать полипептидную цепь. Увеличение стабильности белка в результате повышения давления было продемонстрировано экспериментально для глутамат дегидрогеназы гипертермофильных архей *Pyrococcus furiosus* (Sun *et al.*, 1999) и *Thermococcus litoralis* (Sun *et al.*, 2001). Опубликованные данные подтверждают полученные в данной работе: действительно, увеличение давления значительно стабилизирует белковую глобулу, а также белковые комплексы, сформированные ферментами. Предполагается, что такая стабилизация может возникнуть в результате изменения стабильности нативных состояний в результате снижения флуктуаций полипептидной цепи при высоких давлениях и температурах (Sun *et al.*, 1999). Результаты полученные в настоящей работе демонстрируют, что эффект снижения флуктуации при высоком давлении и температуре может различаться для белков мелководных и глубоководных организмов.

### 3.9. Влияние высокого давления и температуры на функцию белка Nip7

Результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что структурные изменения и флуктуации С-терминального домена больше, чем N-терминального в течение моделирования молекулярной динамики. Возможно, пластичность С-терминального домена объясняется тем, что он достаточно мал, порядка 60 аминокислотных остатков, и он стабилизирован преимущественно гидрофобным ядром (несколько солевых мостиков этого домена координируют положение петель и терминальные районы спиралей). Пластичность ДНК/РНК-связывающих доменов делает возможным неспецифическое связывание (Kalodimos *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2011; Voehr *et al.*, 2012). Такая подвижная структура, в отличие от жестко координированных компонентов, подчиняющихся правилу ключ-замок, обеспечивает возможность связывания с поли-U и поли-AU последовательностями РНК со слабой вторичной структурой (Coltri *et al.*, 2007; Luz *et al.*, 2010). Поэтому, пластичность, которую мы наблюдаем для РUA-домена белка Nip7, по-видимому, является его важной функциональной особенностью.

Одной из интересных особенностей для этого домена является то, что для остатков, формирующих взаимодействие с РНК, характерно формирование солевых мостиков, которые стабилизируются при повышении температуры. Возможно этот эффект позволяет стабилизировать конформацию боковых групп этих остатков так, чтобы облегчить связывание с РНК. Интересно, что подобный эффект стабилизации конформации боковых групп аминокислот за счет формирования солевых мостиков наблюдался в активном центре ацилфосфотазы у *Pyrococcus horikoshii* (Lam *et al.*, 2011). Интересно отметить, что такой механизм в большей степени характерен для модели глубоководного белка NIP7-ABY.

В дополнение к более объемному и структурно стабильному гидрофобному ядру сформированного остатками, входящими в состав  $\beta$ -листов 1-4, N-терминальный домен имеет сложную сеть солевых мостиков, которые стабилизируют упаковку элементов вторичной структуры. В целом в N-терминальном домене наблюдаются меньшие флуктуации по сравнению с C-терминальным. В связи с этим интерес представляют структурно нестабильные сегменты N-терминального домена (позиции 30-40, 49-59, 69-79). Два из этих сегмента это  $\beta$ -шпильки (30-40, 69-79). Отклонения от кристаллографической структуры в этих сегментах происходят без существенных изменений вторичной структуры. Они изгибаются по направлению к  $\alpha_1$ -спирали в обеих моделях. Эти конформационные изменения могут возникнуть в результате взаимодействий в сети солевых мостиков (GLU10-ARG4, ARG37-GLU10, GLU75-ARG37), сближая  $\beta$ -лист и  $\alpha_1$  спираль N-терминального домена. Эта сеть взаимодействий в свою очередь может стабилизироваться через объемное гидрофобное ядро сформированное гидрофобными остатками в центре  $\beta_1$ - $\beta_5$  листов.

С точки зрения предполагаемой функциональной роли N-терминального домена, по-видимому, целесообразно рассмотреть петлю между второй и третьей  $\alpha$ -спиралями (позиции 49-59). Эта петля лежит рядом с длинной неполярной областью на поверхности N-терминального домена, которая простирается от  $\alpha_2$ -спирали до бороздки между N- и C-терминальными доменами. Эта петля лежит на стороне противоположной полярной части поверхности белка Nip7 (Рисунок 8). Конформационные изменения в области  $\alpha_2$ - $\alpha_3$  могут быть вызваны высоким скручивающим напряжением основной цепи в данном регионе. Он подвергается резкому изгибу на самом конце короткой  $\alpha_3$ -спирали, затем формирует один виток спирали, который переходит в лист  $\beta_5$  (Рисунок 8). Позиции N- и C-терминальных аминокислот этого фрагмента фиксированы глобулой N-терминального домена. Дополнительными дестабилизирующими факторами для данного региона являются чередующиеся полярные и гидрофобные

остатки (позиции 46, 49, 53, 55), которые, в результате конформационных изменений основной цепи участка  $\alpha_2$ - $\alpha_3$ , могут вступить в контакт с растворителем. Можно предположить, что данный изгиб вместе длинной областью неполярной поверхности может играть важную роль во взаимодействии белка Nip7 с предполагаемым экзосомальным белком. Важно отметить, что предсказание белок-белковых взаимодействий с помощью сервера SDPPRED продемонстрировало, что большинство аминокислотных остатков этой области могут с высокой степенью вероятности быть вовлечены в белок-белковые взаимодействия у обеих моделей NIP7-ABY и NIP7-FUR (Приложение № 10).

Структурная лабильность белков может выполнять важную роль в распознавании молекул. Например, участки полипептидной цепи мономеров, лишенных упорядоченной структуры, могут обеспечивать белковые взаимодействия (Fong *et al.*, 2009) и принимать упорядоченную конформацию в процессе связывания (Uversky *et al.*, 2013). Что касается белка Nip7, внутренняя гибкость кажется наиболее вероятной (Janin *et al.*, 2013), что гарантирует наличие конформационного ансамбля, требуемого для РНК-белок и белок-белкового взаимодействия (Voehr *et al.*, 2009).

Результаты настоящего исследования показывают, что структурная подвижность для обоих белков как в случае всего белка, так и его различных областей, имеет большое значение для его функций, в частности, для взаимодействия с молекулой РНК и с белками экзосомального комплекса.

### **3.10. Различия в динамике белков мелководного и глубоководного организмов и их эволюционное значение**

Одной из задач настоящей работы являлась оценка влияния аминокислотных замен на динамические свойства структур белков из глубоководных и мелководных организмов.

Различия аминокислотных последовательностей белков Nip7 *P.abysssi* и *P.furiosus* заключаются в 47 заменах (Рисунок 8Б). Эти замены могут быть разделены на категории I-VI.

(I) Замены, в результате которых происходит смена полярной аминокислоты у *P.abysssi* на неполярную у *P.furiosus* (7 замен): 2 (R→I), 21 (Y→F), 58 (Y→F), 59 (S→A), 66 (T→M), 80 (N→A), 119 (K→V).

(II) *P. abysssi* → *P. furiosus* замены, в результате которых смена заряженной аминокислоты на незаряженную при сохранении полярности (5 замен): 23 (E→T), 27 (E→N), 44 (E→N), 144(K→S), 154(K→T).

(III) Замены неполярной аминокислоты у *P.abysssi* на полярную у *P.furiosus* (1 замена): 140 (L→R).

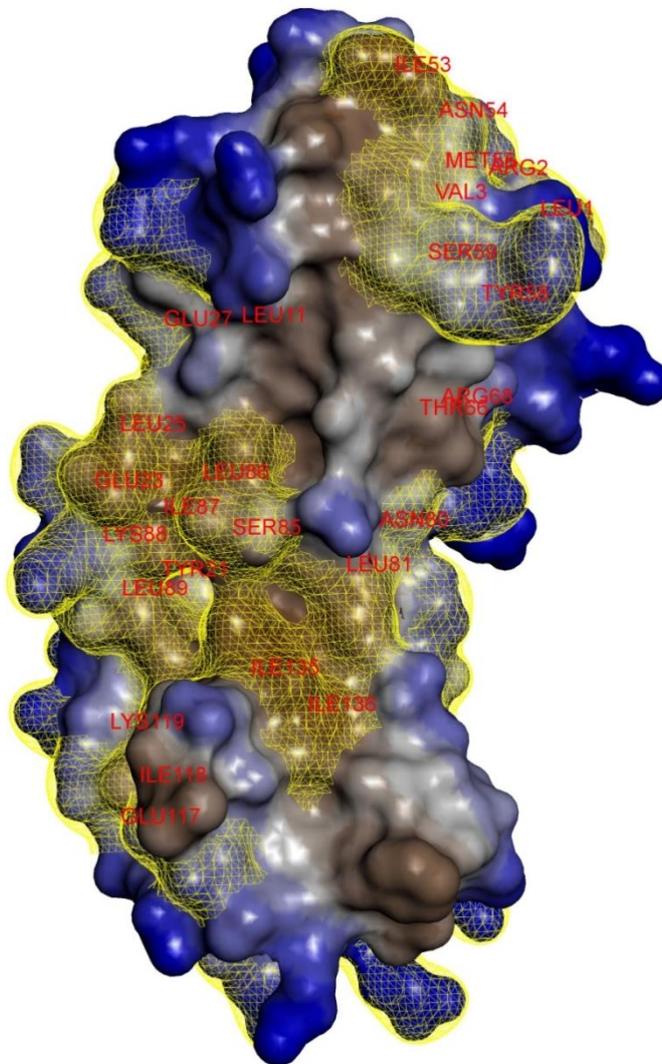
(IV) *P. abysssi* → *P. furiosus* замены незаряженной полярной боковой группы на заряженную боковую группу: 121 (Q→K).

(V) Замены *P. abysssi* → *P. furiosus*, в результате которых происходит смена знака заряда аминокислоты на противоположный (5 замен): 88 (K→D), 113 (E→K), 117 (K→Q), 147 (R→E).

Это количество радикальных замен значительно превышает порог, который мы могли бы ожидать при нейтральной эволюции этих двух белков в процессе их дивергенции от общего глубоководного предка. Соответственно, данные радикальные замены свидетельствуют об эволюции в результате позитивного отбора (Gunbin *et al.*, 2009). Однако, принимая во внимание, что оба белка при всех исследованных нами условиях оказываются стабильны и имеют близкую конформацию, нельзя выделить какой-то единственный фактор, на который эти замены могут значимо влиять.

Замены, которые относятся к категории I, II в большинстве располагаются в N-терминальном домене белка, при этом 3 из них расположены в участке, соединяющей первую альфа-спираль с третьей  $\beta$ -нитью. Трехфакторный анализ параметров RMSDL и RMSF показал, что в

этих позициях изменения указанных параметров значительно отличаются у двух моделей белков. Значения параметра RMSDL для указанного сегмента выше у модели NIP7-FUR, значения RMSF для некоторых остатков выше у модели NIP7-ABY, для некоторых у NIP7-FUR. Часть замен нарушают солевые мостики в структуре NIP7-FUR (2-33 и 23-88), одна из замен (Y21→F21) происходит в гидрофобном ядре белка. Интересно, что эти замены затрагивают участок поверхности N-терминального домена, который, содержит подвижные остатки (нить  $\beta_2$  и петлю  $\beta_2$ - $\beta_3$ , а так же остатки в позициях  $\alpha_2$ - $\alpha_3$ ; рисунок 8) и может, по нашему мнению, принимать участие в белок-белковых взаимодействиях (Рисунок 18).



**Рисунок 18.**

Поверхность локализации аминокислотных замен в белке Nip7 *P.abysssi*→*P.furiosus*. Поверхность построена с помощью программы

Accelrys Discovery Studio Visualizer с радиусом молекулы воды 1.4 Å. Области поверхности: полярная - синяя; гидрофобная - коричневая. Желтым цветом обозначены аминокислотные замены.

Вероятно, наблюдаемые замены в N- терминальном домене могут каким-то образом изменять характер взаимодействий этого участка белка с молекулой-партнером. При этом следует отметить, что характер изменения флуктуаций для участка цепи в районе  $\alpha_2$ - $\alpha_3$  при увеличении давления для двух белков радикально отличается: у мелководного белка флуктуации значительно увеличиваются, а у глубоководного наоборот, уменьшаются (Рисунок 17). Для глубоководного белка характерно также общее уменьшение флуктуаций во всем N-терминальном домене при увеличении давления. Возможно, величина флуктуаций для успешного связывания должна находиться в определенных пределах, и их общее уменьшение при повышении давления у глубоководного белка также является адаптивным.

Замены в этом сегменте происходят с повышением гидрофобности остатков у мелководных организмов. Такие изменения могут способствовать стабилизации белок-белковых взаимодействий между Nip7 и его партнером, поскольку гидрофобные взаимодействия вносят существенный вклад в стабильность белок-белковых интерфейсов. Ранее был проведен анализ индексов асимметрии аминокислотных замен в сотнях белках рода *Pyrococcus*, начиная от общего глубоководного предка организмов *P. furiosus*, *P. horikoshii* и *P. abyssi* до мелководного организма *P. furiosus*. Анализ показал, что значения индексов имеют положительную корреляцию с гидрофобностью аминокислот и отрицательную корреляцию с их полярностью (Афонников и др., 2011). Таким образом, изменения в последовательностях, которые наблюдаются для белка Nip7 *P. furiosus* являются характеристикой его протеома в целом: полярные аминокислотные остатки преимущественно были заменены на неполярные. Однако вопрос о том, является ли этот тренд отражением стабилизации

белок-белковых взаимодействий или структуры белков в целом требует дальнейшего анализа.

Значимое влияние оказывают замены на конформационные параметры белков в районе, соединяющем два домена белка (параметры RMSDL и RMSF в участке  $\beta_6$ - $\alpha_4$ ). Вероятно, мутации в нем способствуют изменению взаимной ориентации доменов, и к увеличению структурных отклонений в С-терминальном домене белка у модели NIP7-FUR, по сравнению с NIP7-ABY (Рисунок 16).

Что касается РНК-связывающего домена, для него в мелководном белке характерны радикальные замены, которые меняют заряд остатка. Они приводят к тому, что нарушается формирование некоторых солевых мостиков, в частности между остатками, которые участвуют в распознавании РНК. Такие различия, которые мы наблюдали в процессе молекулярного моделирования, могут отражать различия в способах взаимодействий между РНК и белками Nip7 при высоких и низких давлениях.

Полученные результаты можно резюмировать следующим образом. Во-первых, исследованные нами модели являются стабильными в исследованном нами интервале давлений и температур, их структуры оказываются близкими к кристаллографической структуре Nip7 *P.abysssi*. Таким образом, замены в белке Nip7 *P.furiosus*, практически не влияют на общую стабильность белковой глобулы.

Во-вторых, в исследованном нами интервале параметров давлений и температур, увеличение температуры в большей степени влияет на динамические свойства моделей, приводя к значимому изменению локальной конформации и увеличению флуктуаций для большого количества остатков (в случае RMDF – для всех). Влияние давления выражено в меньшей степени. Значимые конформационные изменения, как и изменения RMSF затрагивают существенно меньшее число остатков, в сравнении с температурным воздействием. Общее влияние давления на

модели белков выражается в уменьшении флуктуаций полипептидной цепи и компактизации белковой глобулы при увеличении давления.

Анализ молекулярной динамики позволил изучить функциональные особенности белков Nip7. Прежде всего, были обнаружены значимые различия между флуктуациями полипептидной цепи двух доменов: флуктуации РНК-связывающего домена оказались выше. Обнаруженный эффект, по-видимому, отражает функциональные различия двух доменов Nip7. РНК связывающий домен отвечает за неспецифическое связывание поли-А и поли-AU трактов РНК, для чего необходима относительно высокая пластичность этого домена. Луз и соавт. (Luz *et al.*, 2010), как было указано в обзоре литературы, на основании экспериментальных данных предположили, что Nip7 может взаимодействовать с одной из субъединиц экзосомы (предположительно Csl4) за счет N-терминального домена и обеспечивает ингибирование ее функций. Это ингибирование может осуществляться за счет белок-белковых взаимодействий. Мы предполагаем, что более высокая стабильность N-терминального домена обеспечивает более высокую специфичность и стабильность белок-белковых взаимодействий Nip7 с субъединицей экзосомы.

N-терминальный домен содержит высокоподвижный участок в районе спиралей  $\alpha_2$ - $\alpha_3$ . Он характеризуется низкой устойчивостью вторичной структуры, в результате взаимное положение полярных и гидрофобных остатков в этом сегменте белка может меняться существенным образом. Такое динамическое поведение этого участка позволило нам предположить возможное участие этого сегмента белка в белок-белковых взаимодействиях.

Анализ солевых мостиков показал, что их число в модели NIP7-ABY больше, и они формируют более разветвленную сеть, чем в модели NIP7-FUR. Для ряда солевых мостиков, стабилизирующих участки вторичной структуры белка, было зафиксировано значимое увеличение устойчивости при повышении температуры.

Мы выделили позиции, динамические свойства которых отличаются для моделей NIP7-ABY и NIP7-FUR. В N-терминальном домене эти позиции локализованы преимущественно в районе гидрофобной части поверхности, где наблюдается большая часть замен полярных остатков *P.abysssi* на гидрофобные *P.furiosus*. В этой же области белка происходят наибольшее число замен с полярных у глубоководного организма на неполярные у мелководного. Это позволяет высказать гипотезу о вовлеченности этих остатков во взаимодействия с экзосомой и адаптации структуры этих взаимодействий под действием аминокислотных замен на этапе дивергенции Nip7 *P.furiosus* от глубоководного предка. Эти результаты согласуются с результатами анализа молекулярной эволюции аминокислотных последовательностей, полученные ранее Гунбиным с соавторами (Gunbin *et al.*, 2009), которые показывают, что высокая доля радикальных замен наблюдается в белках системы трансляции на этапе эволюции *P.furiosus* от глубоководного предка, для которых характерно высокая интенсивность белок-белковых и РНК-белковых взаимодействий. Замены могут отражать структурные изменения молекулярных комплексов, которые происходят при эволюции организмов в процессе смены ими условий существования с глубоководных к мелководным.

## Глава 4. Поиск мутаций, связанных с адаптацией к экстремальным условиям в белках Nip7 архей

### 4.1. Анализ специфичных позиций

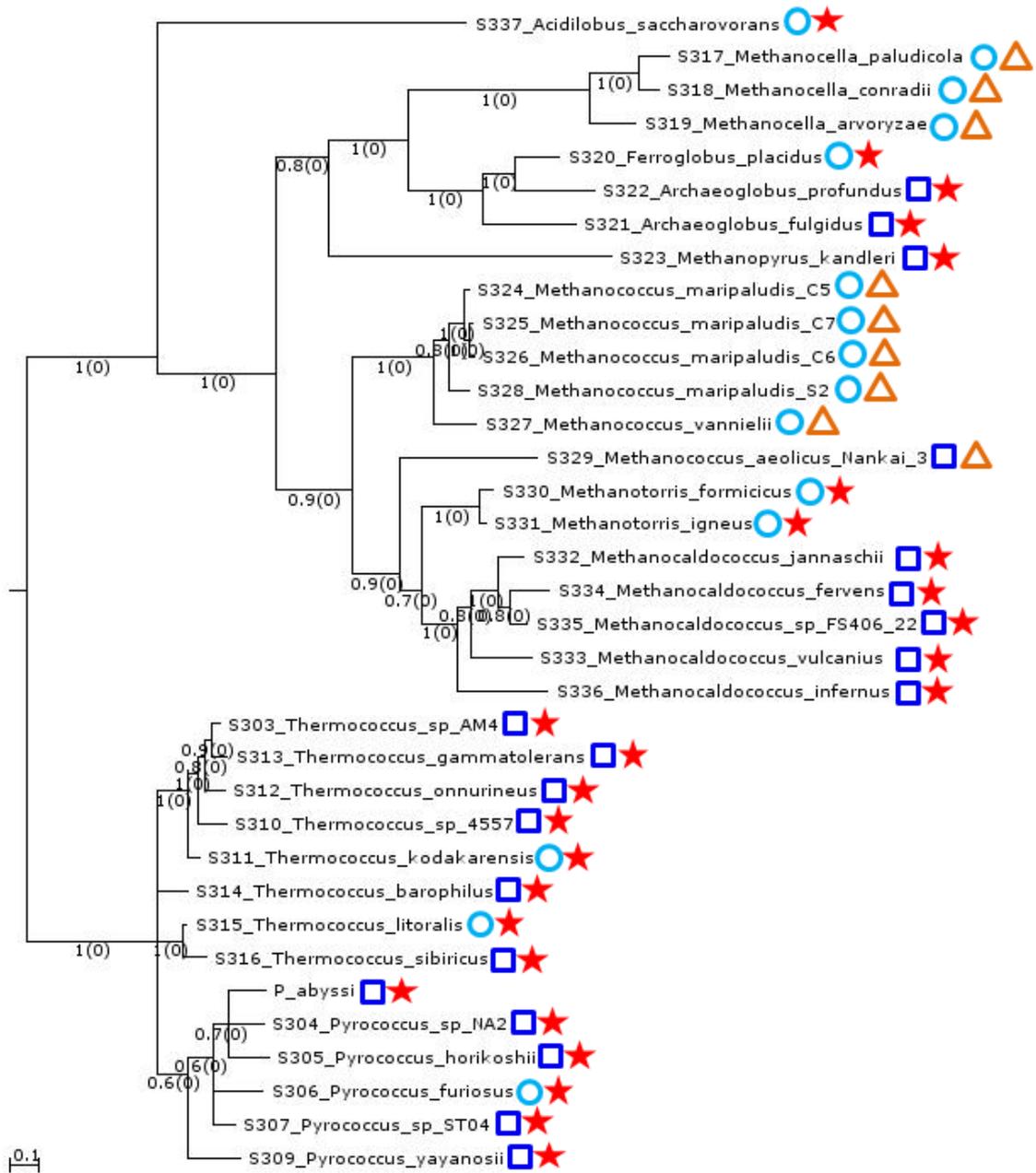
Для выявления позиций, замены в которых происходят специфическим образом по отношению к условиям внешней среды организмов была собрана выборка из 35 белков гомологов Nip7 архей. В данную выборку вошли белки представителей следующих родов архей: *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Methanococcus*, *Methanocaldococcus*, *Methanocella*, *Ferroglobus*, *Archaeoglobus*, *Methanopyrus*, *Methanotorris*, *Acidilobus*. Полученная выборка была разделена двумя способами: а) мелководные и глубоководные организмы, б) термофильные и мезофильные организмы. Информация по организмам, белки которых сформировали выборку, представлена в Таблице 4.

**Таблица 4.** Характеристики температуры и глубин местообитаний организмов, использованных для анализа молекулярной эволюции белков Nip7. Видовые названия гипертермофильных организмов выделены жирным шрифтом, глубоководных – подчеркнуты.

	Род	Вид	Среда обитания	Температура обитания	Глубина обитания	Ссылка
1	Pyrococcus	<b>abyssi</b>	подводные вулканы	102°C	2200м	Erauso <i>et al.</i> , 1993
2		<b>furiosus</b>	гидротермальные источники	100°C	мелководье	Fiala <i>et al.</i> , 1986
3		<b>horikoshii</b>	подводные вулканы	98°C	1400м	González <i>et al.</i> , 1998
4		<b>sp.NA2</b>	подводные вулканы	93°C	глубоководье	Lee <i>et al.</i> , 2011
5		<b>sp.ST04</b>	гидротермальные источники	100°C	2290м	Jung <i>et al.</i> , 2012
6		<b>yavanosii</b>	подводные вулканы	98°C	4100м	Birrien <i>et al.</i> , 2011
7	Thermococcus	<b>kodakarensis</b>	гидротермальные источники	86°C	мелководье	Atomi <i>et al.</i> , 2004
8		<b>sp.4557</b>	подводные вулканы	100°C	2000м	Wang <i>et al.</i> , 2011
9		<b>onnurineus</b>	подводные вулканы	86°C	глубоководье	Seob <i>et al.</i> , 2006
10		<b>gammatolerans</b>	гидротермальные источники	88°C	2616м	Jolivet <i>et al.</i> , 2003
11		<b>barophilus</b>	гидротермальные источники	95°C	3550м	Marteinsson <i>et al.</i> , 1999
12		<b>litoralis</b>	гидротермальные источники	88°C	мелководье	Neuner <i>et al.</i> , 1990
13		<b>sibiricus</b>	нефтяные месторождения	88°C	глубоководье	Miroshnichenko <i>et al.</i> , 2001
14		<b>sp. AM4</b>	гидротермальные источники	80°C	3600м	Oger <i>et al.</i> , 2011
15	Methanocella	<b>paludicola</b>	рисовые поля	37°C	мелководье	Sakai <i>et al.</i> , 2008

16		conradii	рисовые поля	37°C	мелководье	Lu <i>et al.</i> , 2012
17		arvoryzae	рисовые поля	45°C	мелководье	Sakai <i>et al.</i> , 2010
18	Ferroglobus	<b>placidus</b>	гидротермальные источники	65-95°C	мелководье	Hafenbradl <i>et al.</i> , 1996
19	Archaeoglobus	<b>fulgidus</b>	нефтяные месторождения	75°C	глубоководье	Stetter, 1988
20		<b>profundus</b>	гидротермальные источники	90°C	глубоководье	Burggraf <i>et al.</i> , 1990
21	Methanopyrus	<b>kandleri</b>	подводные вулканы	110°C	2000м	Kurr <i>et al.</i> , 1991
22	Methanococcus	maripaludis C5	солончаки	38°C	мелководье	Jones <i>et al.</i> , 1983
23		maripaludis C7	солончаки	38°C	мелководье	
24		maripaludis C6	солончаки	40°C	мелководье	
25		maripaludis S2	солончаки	40°C	мелководье	
26		aeolicus Nankai-3	донные отложения	46°C	глубоководье	Kendall <i>et al.</i> , 2006
27		vanniellii	илистые отложения	40°C	мелководье	Jones <i>et al.</i> , 1983
28	Methanotorris	<b>formicicus</b>	подводные вулканы	75°C	мелководье	Takai <i>et al.</i> , 2004
29		<b>igneus</b>	подводные вулканы	75°C	мелководье	
30	Methanocaldococcus	<b>jannaschii</b>	подводные вулканы	80°C	2600м	Jones <i>et al.</i> , 1983
31		<b>vulcanius</b>	подводные вулканы	80°C	2600м	Jeanthon <i>et al.</i> , 1999
32		<b>fervens</b>	подводные вулканы	75°C	глубоководье	
33		<b>sp. FS406-22</b>	подводные вулканы	75°C	глубоководье	Jeanthon <i>et al.</i> , 1998
34		<b>infernus</b>	подводные вулканы	85°C	3000м	
35	Acidilobus	<b>saccharovorans</b>	горячие источники	85°C	мелководье	Prokofeva <i>et al.</i> , 2009

На рисунке 19 представлено филогенетическое дерево, построенное по выравниванию белков Nir7 архей из данной выборки. На нем для каждого вида показано к какой экологической группе он относится.



**Рисунок 19.** Филогенетическое дерево последовательностей белков Nip7 выборки архей. Условия обитания определены следующими условными обозначениями: синий квадрат – глубоководный организм, голубой круг – мелководный организм, красная звезда – термофильный организм, оранжевый треугольник – мезофильный организм.

Следует отметить, что полученное дерево в целом адекватно отражает таксономическое деление изученных организмов. Все они, за исключением *M. aeolicus*, группируются согласно родам. Для некоторых узлов не удалось, однако, идентифицировать порядок дивергенции с хорошим разрешением (например, у пироккокков и термококков). Анализ филогении показывает, что

представители одного и того же рода обитают, преимущественно, в схожих условиях. В отношении к термофильности эта тенденция выражена в большей степени, чем в отношении глубин местообитаний. Так, без исключений, термофильными являются роды *Thermococcus*, *Pyrococcus* и *Methanocaldococcus*.

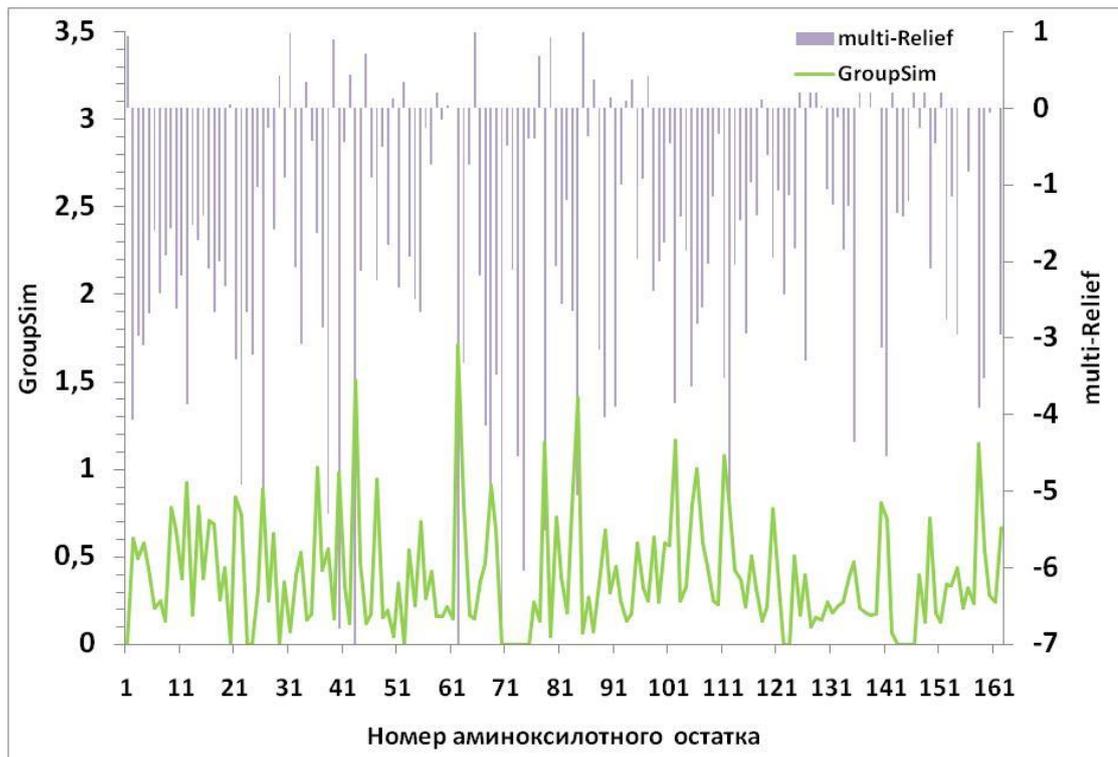
Отметим, также, что в большинстве случаев термофильные организмы – это организмы, обитающие на большой глубине, а значит при повышенном давлении. Но есть и исключения: *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus kodakarensis*, *Ferroglobus placidus* и *Acidilobus saccharovorans* обитающие в мелководных гидротермальных источниках. Мезофильные организмы представлены в основном мелководными организмами, обитающими на солончаках и илистых отложениях (род *Methanococcus*) и рисовых полях (род *Methanocella*).

Результаты анализа множественного выравнивания приведены в таблицах 5 и 6. В данных таблицах приведены величины значений GroupSim (Capra *et al.*, 2008), Z-вес, оцененный программой multi-Harmony (Pirovano *et al.*, 2006) и консенсусная последовательность.

Рассмотрим, прежде всего, результаты идентификации специфических позиций белка по отношению к глубинам местообитаний организмов (Рисунок 20А). Программа multi-Harmony идентифицирует для этой группировки организмов 36 значимых позиции, программа GroupSim – 26 позицию. Число значимых позиций, общих для обеих программ составило 17 (Таблица 5). Более детальная информация по частотам встречаемости аминокислот в этих позициях для разных групп организмов приведена в таблице 5 и на Рисунке 20.

**Таблица 5.** Результаты анализа встречаемости аминокислот в позициях белка Nip7, замены в которых статистически связаны с глубиной местообитаний микроорганизмов.

А.О.	Индекс multi-Harmony	Индекс GroupSim	Консенсус multi-Harmony		Замены	
			Мелководные	Глубоководные	NIP7-ABY	NIP7-FUR
D12	-3,87	0,923725	Agqesd	EDa		
Y21	-3,28	0,838587	FYLA <sub>v</sub>	FYahr	Y	F
G22	-4,91	0,738691	GSE_ftl	Ga_v		
H26	-5,18	0,887256	Fnp <sub>pyeh</sub>	Hes <sub>y</sub>		
Y40	-6,79	0,983257	FYVmi	Yfc		
N43	-7,48	1,50732	STn	Ns		
T62	-7,36	1,714919	Itl	Tir <sub>vn</sub>		
R68	-5,06	0,912453	KGE <sub>ds</sub>	Ksgr	R	K
Y78	-5,52	1,149012	Lahrt <sub>vy</sub>	RYhk		
F84	-5,05	1,406428	FMAI <sub>lv</sub>	Fast		
F102	-3,85	1,168824	Sgk <sub>mft</sub>	Faes <sub>vm</sub>		
T105	-3,64	0,792979	Lvt	LT		
P111	-3,53	1,07779	Ftp	FPI		
K112	-5,1	0,822311	GDK <sub>er</sub>	RKpa		
L140	-3,13	0,810642	RKfin	LRiky <sub>fm</sub>	L	R
I141	-4,54	0,712872	Yfg <sub>tai</sub>	Iklw <sub>svf</sub>		
E158	-3,91	1,147305	Wael	Ew		



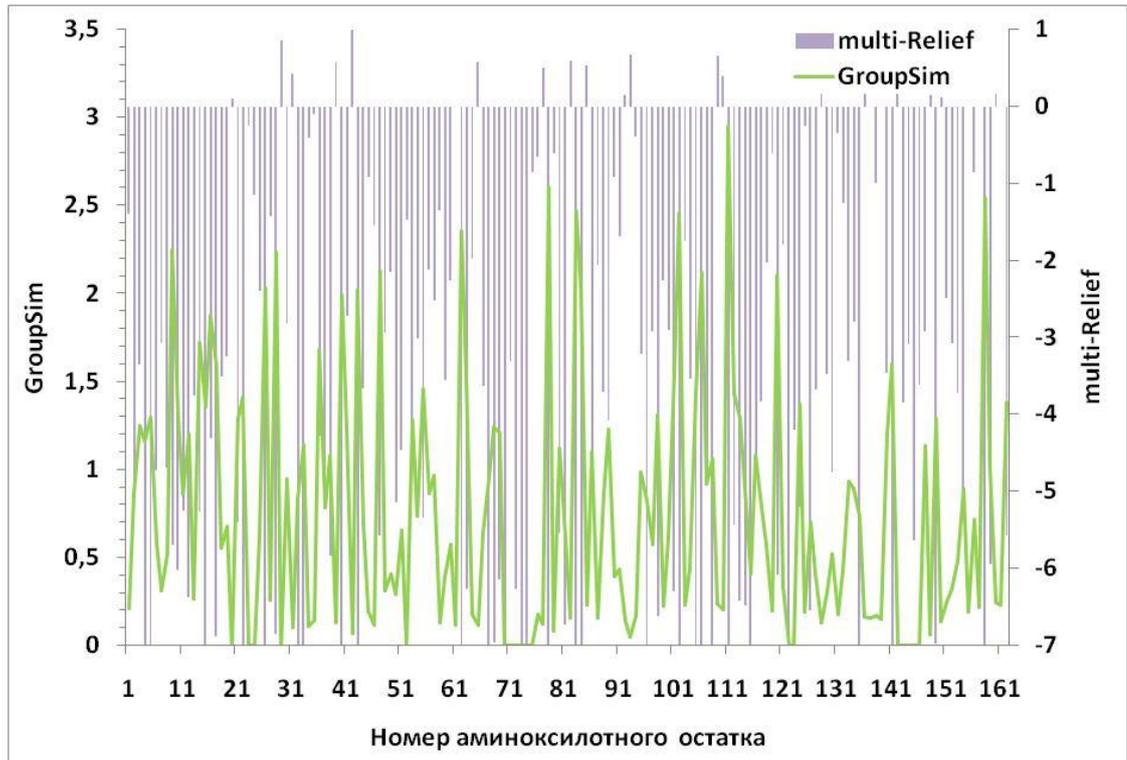
**Рисунок 20.** График зависимости индекса специфичности к давлению GroupSim (левая шкала) и multi-Relief (правая шкала) от номера остатка.

В случае со специфичностью к температуре число значимо специфичных позиций для multi-Harmony составило 102 позиции, для GroupSim – 74 позиция. Количество обнаруженных специфических позиций в данном случае значительно больше, чем при анализе специфичности по отношению к давлению. Пересечение результатов двух программ также значительно для температуры (Таблица 6, Рисунок 21).

**Таблица 6.** Значения score для позиций специфичных к температуре. Звездочкой отмечены аминокислоты, участвующие в связывании РНК.

А.О.	Индекс multi-Harmony	Индекс GroupSim	Консенсус multi-Harmony		Замены	
			Мезофилы	Термофилы	NIP7-ABY	NIP7-FUR
R2	-4,92	0,862007	KEt	Rilmptnk	L	I
V3	-3,36	1,245426	EKdn	KVYadilntr	R	I
R4	-7,56	1,159381	KLNSE	Raegyk		
R5	-10,71	1,296704	E	ERk		
W9	-5,7	2,247747	Imv	IWfv		
E10	-6,02	1,30425	RK	Efsark		
L11	-5,25	0,859169	HRAnt	LEKfYins	L	I
D12	-6,37	1,199469	Agqes	Dae		
I14	-5,27	1,719349	DSnk	Ilryags		
L15	-8,3	1,355927	Rny	Lyamkr		
K16	-4,31	1,873717	WYf	YKRpf		
E17	-6,88	1,591867	Glv	Eacfilmtg		
Y21	-5,41	1,287672	YALv	FYhra	Y	F
G22	-8,67	1,411775	SEfl	Gat_v		
H26	-8,54	2,030333	Fye	Henpsy		
F28	-6,85	2,230152	Nkd	Faehklrstyn		
V32	-7,16	0,834862	Lmr	Vpkl		
E33	-7,03	1,139049	RVKQe	Edk		
Y36	-4,28	1,67769	WKSar	WYFak		
D38	-5,84	1,0774	Nde	Det		
Y40	-11,03	1,99118	FVmi	Yfc		
N43	-13,1	2,015722	ST	Nts		
W47	-5,57	2,124057	KILmr	Waflyei		
I53	-4,21	1,280642	RNk	Lefinrv_m_k	I	L
N54	-3,02	0,73792	DFHe	FKdeglnt_pr	N	T
M55	-5,34	1,455961	DPKet	VLadenpmqi	M	V
T62	-8,6	2,35444	Il	Tlrvin		
F63	-6,27	1,521051	HNcimsy	Fipykv		
I67	-9,04	0,948432	Lvf	Ifrv		
R68	-6,96	1,242199	GEs	Kdsgr	R	K
V69	-6,14	1,207367	KElr	Vaiskr		

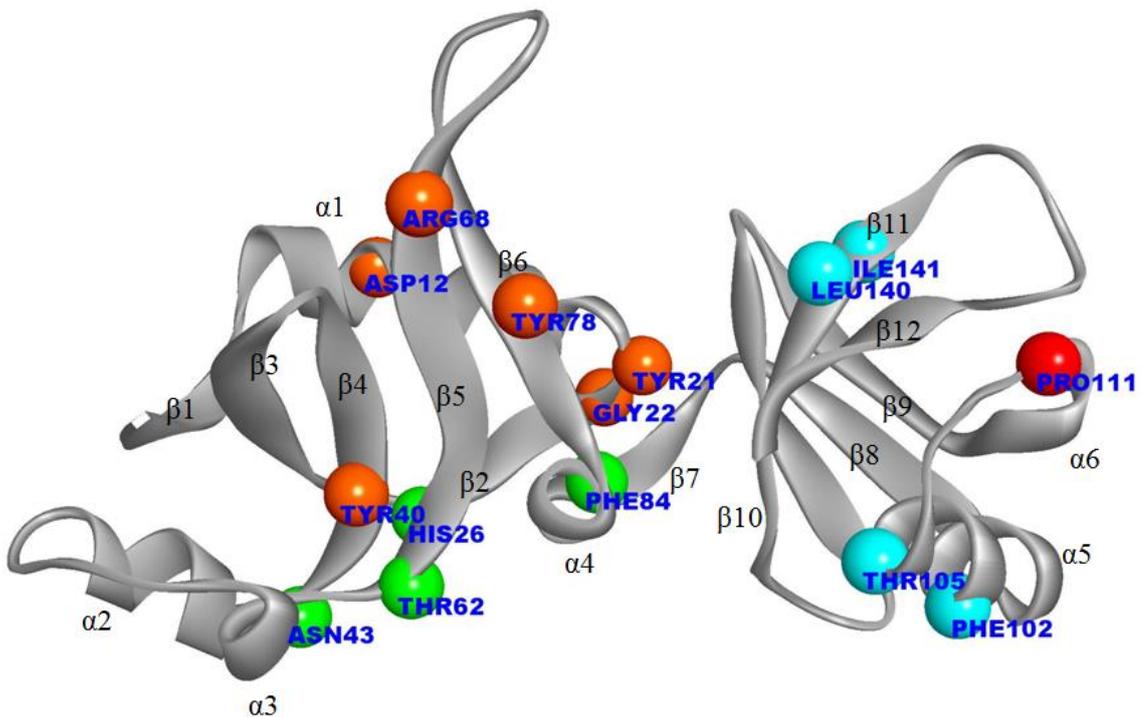
Y78	-15,52	2,603062	Latv	RYhk		
N80	-5,55	1,117046	St	Naghts	N	A
F83	-10,71	2,466478	G	GFI		
F84	-8,76	2,008857	AMIlv	Fsta		
L86	-4,75	1,097554	Lim	LFeirwy	L	F
K88	-3,71	0,863949	SA	KSDilnva	K	D
L89	-4,07	1,228284	DRSKq	PRIVksln	L	I
I95	-3,22	0,985599	IKRVe	IVwy	I	V
L96	-7,1	0,825201	Vi	Liv		
S101	-6,3	1,547052	E	SGAE		
F102	-9,01	2,454177	Sgt	Faeksvm		
T105	-8,75	1,432352	Lv	LT		
T106	-9,14	2,117894	Y	YT		
G107	-4,8	0,917548	EGns	G		
K108	-11,72	1,060643	R	RK		
P111	-9,9	2,95033	F	FPlt		
K112	-5,43	1,430448	GKD	RKepa		
E113	-6,42	1,290116	TS	KSERgn	E	K
A114	-6,48	0,896767	S	AGSh		
R116	-4,59	1,080623	TII	Remlvik		
E117	-3,83	0,783642	Ew	EKdqr	E	K
W120	-6,09	2,105559	Ge	Wdeg		
K124	-5,21	1,370372	Gde	K_sdrq		
V126	-6,55	0,702599	Vi	VILs	V	I
G133	-3,31	0,932335	GKR	Gldr		
I135	-7,82	0,735629	ALf	Icpvf	I	V
L140	-3,46	1,197733	Knr	LRyikmf	L	R
I141	-7,75	1,597449	Yfa	Igkltwsvf		
F149	-6,97	1,287697	IMTL	Frimv		
K154	-5	0,891435	AMvk	KTgirv	K	T
E158	-8,81	2,544396	WI	Eaw		
F159	-5,95	1,009954	Y	YFi		
R162	-5,58	1,386476	EGHkny	Rhke		



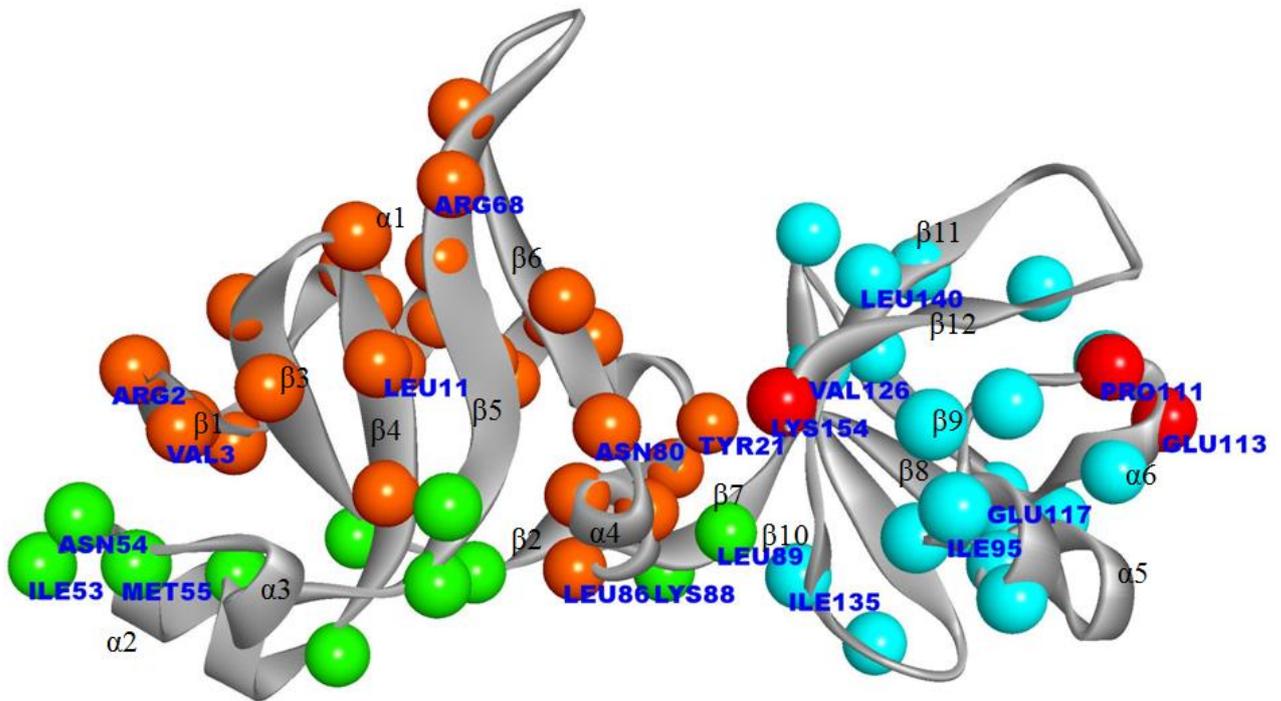
**Рисунок 21.** График зависимости индекса специфичности к температуре GroupSim (левая шкала) и multi-Relief (правая шкала) от номера остатка.

На Рисунке 22 приведены трехмерные структуры белка Nir7, на которых отмечены позиции специфичные: А – к давлению, Б – к температуре, по совокупному результату работы двух программ.

**А**



Б



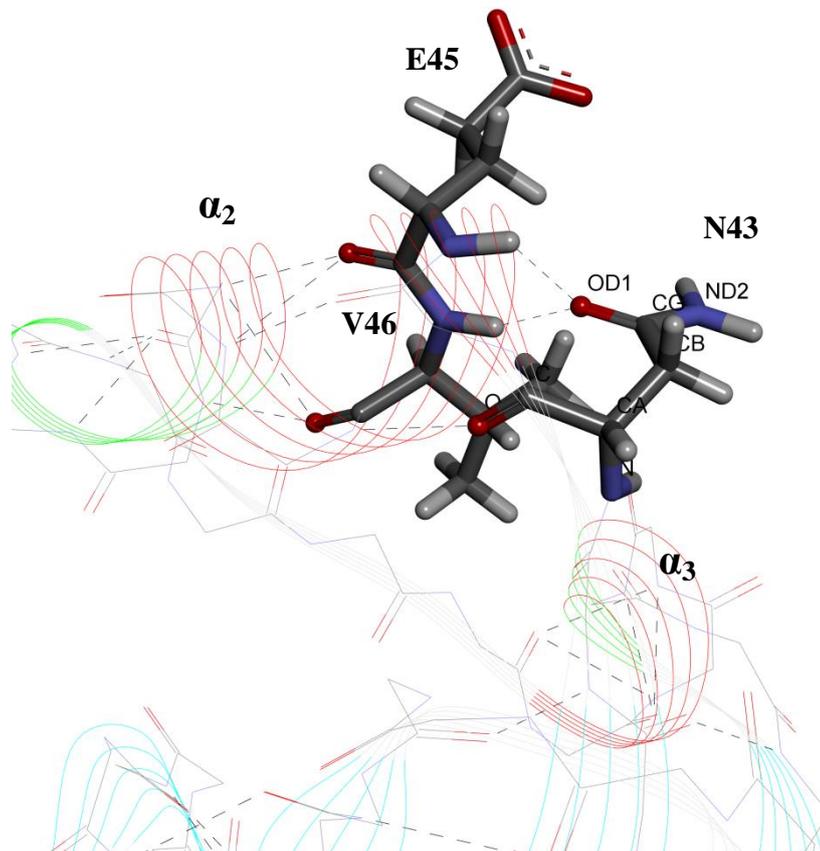
**Рисунок 22.** (А) Позиции специфичные к давлению: зеленым цветом отмечены остатки в возможной области белок-белкового взаимодействия, оранжевым - позиции структурных элементов N-терминального домена, голубым - позиции находящиеся вокруг активного центра белка, красным – активный центр белка Nip7; (Б) Позиции специфичные к температуре: зеленым цветом отмечены остатки в возможной области белок-белкового взаимодействия, оранжевым - позиции структурных элементов N-терминального домена, голубым - позиции находящиеся вокруг активного центра белка, красным – активный центр белка Nip7.

Рассмотрим более детально замены аминокислотных остатков в позициях, специфичных к давлению. Их можно разделить на несколько групп по расположению в белковой структуре: позиции, располагающиеся в возможной области белок-белкового взаимодействия (HIS26, ASN43, THR62, PHE84), позиции структурных элементов N-терминального домена (ASP12, TYR21, GLY22, TYR40, ARG68, TYR78), позиции находящиеся вблизи области C-терминального домена, взаимодействующей с РНК (PHE102, THR105, LEU140, ILE141, GLU158) и позиции, которые участвуют связывании с РНК (PRO111) (Рисунок 22А).

При исследовании физико-химических свойств аминокислотных остатков в данных позициях, было выявлено, что в 10 из 17 позиций

специфические замены аминокислот характеризуются заменой полярного остатка у глубоководных организмов на неполярный у мелководных. Это позиции, соответствующие аминокислотным остаткам D12, Y21, H26, Y40, N43, T62, R68, Y78, T105, E158 (см. Табл. 5, колонка «Консенсус multi-Harmony»). При этом следует отметить, что из этих 10-ти позиций 8 расположены в N-терминальном домене, и только две в C-терминальном.

Рассмотрим в качестве примера позицию белка 43, в белках *P.furiosus* и *P.abysssi* в этой позиции находится аспарагин. Эта аминокислота наиболее часто встречается в белках у глубоководных организмов, а так же у термофильных. Интересной особенностью этого остатка является то, что карбоксильная группа CO боковой цепи формирует водородные связи с атомами основной цепи остатков 45 и 46 (Рисунок 23).



**Рисунок 23.** Водородные связи боковой группы остатка N43 с основной цепью белка в структуре NIP7-ABY. Ход основной цепи показан цветными линиями, атомная структура остатков N43, E45 и V46. Пунктирными линиями обозначены водородные связи.

По-видимому, основная функциональная роль этих взаимодействий – в стабилизации конформации N-терминального участка альфа-спирали. Интересно отметить, что для остатков 42, 43, 44, 45, 46 вторичная структура в моделях NIP7-ABY и NIP7-FUR остается стабильной (петля и виток альфа-спирали, см. рисунок 23). Для сравнения, C-терминальный конец этой же спирали нестабилен. Его остатки меняют конформацию с альфа-спиральной на поворот и петлю. Вероятно, эти взаимодействия являются важными для функции белка, тем более что эта спираль находится на стороне гидрофобного участка поверхности N-терминального домена.

У глубоководных и термофильных организмов аспарагин замещается на треонин или серин (Таблица 5). Интересно, что как треонин, так и серин в составе бокового радикала несут карбоксильную группу CO. Вероятно, ее наличие и в случае таких замен сохраняет возможность формирования водородных связей между боковым радикалом остатка в позиции 43 и основной цепью остатков в первом витке спирали. В то же время, серин и треонин кроме карбоксильной группы не содержат полярных атомов в боковом радикале в отличие от аспарагина. Вероятно, в дополнение к функции, связанной со стабилизацией спирали, боковая группа может участвовать в других важных взаимодействиях, для которых у глубоководных организмов преимущественно необходима дополнительная полярная группа, а у белков мелководных организмов – нет. Такими взаимодействиями могут быть взаимодействия с белками экзосомы.

Другая замена происходит в позиции, соответствующей позиции 12 ASP у белка Nip7 *P.abysssi*. У подавляющего большинства глубоководных белков в этой позиции полярные, отрицательно заряженные аспарагиновая или глутаминовая кислоты. В мелководной выборке аспарагиновая кислота заменяется на неполярный аланин. Эта позиция приходится на спираль  $\alpha_1$  и участвует в образовании сети солевых мостиков ASP12-LYS16-GLU19, которая стабилизирует данную альфа-спираль. У мелководных же организмов в результате замены нарушается возможность образования этой

сети солевых мостиков. В позиции THR62 у глубоководных архей находится полярный, незаряженный треонин. В случае мелководной выборки – неполярный лейцин и изолейцин. В позиции TYR78 у глубоководных белков находится полярный, незаряженный тирозин. В случае мелководных белков – неполярный лейцин, таким образом, происходит смена полярности остатка.

Не все позиции из Таблицы 5 характеризуются заменами в последовательностях Nip7 *P.furiosus* относительно *P.abysssi*: наблюдается три таких позиции из 17-ти. В позиции 21 тирозин у глубоководного белка заменяется на фенилаланин у мелководного. Так как фенилаланин и тирозин – два наиболее часто встречающихся типа аминокислоты как у глубоководных, так и у мелководных организмов (см. столбец «Консенсус» табл. 5), мы рассчитали частоты встречаемости остатков в мелководной и глубоководной группах последовательностей для более точной оценки эффекта замены Y→F. Процент встречаемости тирозина в глубоководной выборке составил 53%, в то время как в мелководной только 19%. Из чего следует, что в данном случае тирозин является остатком специфичным к группе последовательностей глубоководных организмов, а фенилаланин – к группе мелководных организмов.

В позиции 68 аргинин у глубоководного организма заменяется на лизин у мелководного. Из консенсусной последовательности видно (Табл. 5), что в данной позиции аргинин встречается исключительно у глубоководных организмов, а лизин представлен в обеих выборках. Это не противоречит тому, что мы наблюдаем в белках Nip7 – у модели NIP7-ABY в позиции 68 находится остаток, характерный для глубоководных организмов, у NIP7-FUR – остаток представленный в мелководной выборке. Важно также отметить, что 68 остаток участвует в образовании солевого мостика ARG68-ASP38, который стабилизирует  $\beta$ -листы N-терминального домена белка Nip7.

В позиции 140 лизин у глубоководного организма заменяется на аргинин у мелководного. Это замена неполярного остатка в глубоководном организме на полярный в мелководном и согласуется с частотами

аминокислот у двух этих групп организмов в данной позиции (см. столбец «Консенсус» табл. 5). Важно отметить, что по результатам трехфакторного дисперсионного анализа, все три перечисленные позиции, в которых наблюдаются замены, значимо влияют на изменение параметра RMSDL белка Nip7 двух моделей (Рисунок 16). Полученные результаты в целом согласуются с полученными нами ранее результатами о накоплении неполярных замен в белках мелководных организмов рода *Pyrococcus* в процессе их дивергенции от глубоководных предков (Афонников и др., 2011). Это также согласуется с тем, что существенная часть радикальных замен в последовательности N- терминального домена Nip7 *P.furiosus* по отношению к *P.abysssi* связана с заменой полярной аминокислоты у глубоководного вида на неполярный у мелководного.

При детальном рассмотрении позиций специфичных к температуре, их также можно разделить на несколько групп: позиции, располагающиеся в возможной области белок-белкового взаимодействия (HIS26, PHE28, ASN43, TRP47, ILE53, ASN54, MET55, THR62, PHE63, LYS88, LEU89), позиции структурных элементов N-терминального домена (ARG2, VAL3, ARG4, ARG5, TRP9, GLU10, LEU11, ASP12, ILE14, LEU15, LYS16, GLU17, TYR21, GLY22, VAL32, GLU33, TYR36, ASP38, TYR40, ILE67, ARG68, VAL69, TYR78, ASN80, PHE83, PHE84), позиции находящиеся вокруг активного центра белка в С-терминальном домене (ILE95, LEU96, SER101, PHE102, THR105, THR106, GLY107, LYS108, LYS112, ALA114, ARG116, GLU117, TRP120, LYS124, VAL126, GLY133, ILE135, LEU140, ILE141, PHE149, GLU158, PHE159, ARG162) и позиции, которые входят в состав активного центра белка Nip7 (PRO111, GLU113, LYS154). При рассмотрении позиций специфичных к температуре нами были идентифицированы 19 позиций, для которых наблюдаются замены между NIP7-ABY и NIP7-FUR. В 14 из 19 случаев в обеих моделях белка Nip7 находились остатки, которые относятся к выборке организмов–термофилов. Во всех оставшихся 5 случаях у мелководной модели NIP7-FUR находился остаток, представленный

исключительно в группе организмов-термофилов, в то время как у модели NIP7-ABY – остаток принадлежащий и к термофильной и к мезофильной выборке организмов.

Из Рисунка 22А видно, что в N- терминальном домене аминокислоты в позициях, специфичных к давлению располагаются в области гидрофобной части поверхности (Coltri *et al.*, 2007), которая, по нашему предположению, может участвовать в белок-белковых взаимодействиях.

Сравнение позиций, замены в которых специфичны для давлений и температуры показал, что часть позиций в двух этих группах являются общими (17 позиций), для части позиций характерны специфические замены только по отношению к температуре (47 позиций).

Отметим, что число позиций, специфические замены в которых ассоциированы с температурой обитания, более чем в три раза превосходит число позиций, специфических к давлению. Кроме того, их уровень значимости (*Z*-статистика) для существенной части этих позиций выше, чем для позиций отобранных по специфичности к глубинам местообитаний. Полученные данные могут отражать тот факт, что молекулярная адаптация к высоким температурам в белках Nip7 более выражена, чем к давлениям, т.е. температура является фактором отбора в большей степени, чем давление.

На Рисунке 22Б отмечены аминокислоты специфичные к температуре. Всего таких позиций обнаружено значительно больше, чем специфичных к давлению. Эти позиции затрагивают даже три аминокислотных остатка, входящих в состав РНК-связывающего сайта белка Nip7 – PRO111, GLU113, LYS154.

Замены специфичные к температуре наблюдаются в спирали  $\alpha_1$  N- терминального домена: у термофильных белков – LEU15, LYS16, GLU17, а у мезофильных – ARG15, TYR16, ILE17. Важно отметить, что аминокислоты в 16 и 17 позиции у термофильных белков участвуют в образовании сетей солевых мостиков, которые стабилизируют спираль  $\alpha_1$  и связывают спираль  $\alpha_1$  с листом  $\beta_6$  соответственно. У мезофильных организмов в 16 позиции

происходит замена полярного, положительно заряженного лизина на полярный, но незаряженный тирозин. В 17 позиции полярная, отрицательно заряженная глутаминовая кислота заменяется на неполярный изолейцин. Таким образом, у мезофильных организмов для указанных аминокислотных остатков нарушается возможность формирования солевых мостиков.

Таким образом, проведенный анализ показал, что с одной стороны, для позиций, замены в которых происходят специфическим образом по отношению к глубинам местообитаний организмов, для глубоководных организмов в большей степени характерны замены, увеличивающие гидрофобность остатков у мелководных организмов, по сравнению с глубоководными. Данный эффект в большей степени выражен для N-терминального домена белка, при этом часть выраженных позиций локализованы вблизи гидрофобного участка поверхности этого домена. Это согласуется с характером замен аминокислот в последовательностях белков Nip7 у *P. furiosus* и *P. abyssi*.

В тоже время, для позиций, специфичных по отношению к температуре для термофильных организмов наблюдаются повышенные частоты полярных остатков, в том числе и несущих заряд, что, видимо, позволяет стабилизировать структуру белка за счет образования большего количества солевых мостиков, по сравнению с мезофильными организмами.

## Заключение

В работе проведено исследование влияние высокого давления и высокой температуры на РНК-связывающий белок Nip7 двух видов архей представителей рода *Pyrococcus*: глубоководный организм *P.abysssi* и мелководный – *P.furiosus*. Моделирование влияния высокого давления и температуры на белки осуществлялась с помощью методов молекулярной динамики. Полученные данные продемонстрировали, что структура исследуемого белка является стабильной в широких пределах гидростатических давлений (0.1-100 МПа) при температурах 300 и 373 К. Кроме того, было обнаружено, что повышение температуры приводит к увеличению флуктуаций, в то время как повышение давления стабилизирует белковую структуру. Анализ доменов двух исследуемых белков показал, что С-терминальный PUA домен, в котором находится активный центр белка Nip7, подвержен большим флуктуациям, чем N-терминальный. Этому есть несколько объяснений. Во-первых, белок Nip7 связывается с РНК неспецифично, поэтому он должен быть достаточно пластичным. Во-вторых, в N-терминальном домене обнаружено несколько разветвленных сетей солевых мостиков (одна из них крупнейшая в данном белке), которые стабилизируют данный домен. В С-терминальном домене также были обнаружены сети солевых мостиков, но их количество меньше и они не такие разветвленные. Всего в белке Nip7 обнаружено восемь разветвленных сетей взаимодействий между заряженными остатками. Данные взаимодействия формируют консервативное ядро сетей солевых мостиков, устойчивых как в процессе молекулярной динамики, так и эволюции белков, стабилизирующих упаковку всего белка Nip7.

Анализ поверхности белка доступной растворителю показал, что гидрофобная часть белка глубоководного организма (*P.abysssi*) меньше, чем у мелководного (*P.furiosus*). И наоборот – гидрофильная часть больше мелководного организма, чем у глубоководного. Кроме того, показано, что

давление и температура по разному влияют на изменение доступности остатков растворителю для двух моделей белков. Давление приводит к уменьшению площади поверхности, доступной растворителю. Это наиболее выражено для моделей при высоких температурах.

Анализ специфичных аминокислотных позиций показал, что в исследуемой выборке гомологов белка Nip7 присутствуют специфичные аминокислотные замены, которые в процессе эволюции направлены на образование солевых мостиков для стабилизации белковой структуры при воздействии высокого давления и температуры. Кроме того, мутационный эффект адаптации к температуре оказался выражен в значительно большей степени чем к давлению.

## Выводы

1. Проведенный анализ молекулярной динамики моделей белков Nip7 *P.abysssi* и *P.furiosus* продемонстрировал устойчивость их структур в пределах гидростатических давлений от 0.1 до 100 МПа при температурах 300 и 373 К. Анализ также показал, что повышение температуры приводит к увеличению флуктуаций, а увеличение давления приводит к их снижению.

2. Предложен подход для оценки влияния нескольких факторов внешней среды, а также аминокислотных замен в белках, на структурные параметры их компьютерных моделей на основе многофакторного дисперсионного анализа.

3. Анализ результатов моделирования белков Nip7 *P.abysssi* и *P.furiosus* с помощью предложенного подхода показал, что флуктуации полипептидной цепи у С-терминального (РНК-связывающего) домена белка больше, чем у N-терминального, в силу стабилизации последнего за счет сети солевых мостиков. На основе анализа молекулярной динамики охарактеризован район  $\alpha_2$ - $\alpha_3$  (позиции 49-58) белка Nip7, как наиболее подвижный участок N-терминального домена, функция которого может быть связана с белок-белковыми взаимодействиями.

4. На основе анализа гомологичных последовательностей белка Nip7 архей, выявлены позиции, замены в которых происходят специфическим образом по отношению к температуре и давлениям в местообитаниях этих организмов.

5. Согласно результатам проведенного анализа, одним из факторов стабилизации структуры Nip7 являются сети солевых мостиков, количество которых больше у белков глубоководных и термофильных организмов; аминокислотные остатки на поверхности N-терминального домена у глубоководных организмов более полярны, чем у мелководных, что может быть связано с особенностями их возможных взаимодействий с

субъединицами экзосомы архей, которая отвечает за деградацию молекул РНК.

## Список литературы:

1. Афонников Д.А., Медведев К.Е., Гунбин К.В., Колчанов Н.А. Важная роль гидрофобных взаимодействий при адаптации белков к высоким давлениям // Доклады Академии наук. – Академиздатцентр "Наука" РАН, 2011. – Т. 438. – №. 3.
2. Глякина А. В., Лобанов М. Ю., Галзитская О. В. Поиск структурных факторов, ответственных за стабильность белков из термофильных организмов // Молекулярная биология. – 2007. – Т. 41. – №. 4. – С. 681-687.
3. Лотов В. И. Теория вероятностей и математическая статистика. – Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т, 2006.
4. Сорокина К.Н., Нуриддинов М.А., Розанов А.С., Иванисенко В.А., Пельтек С.Е.. Компьютерный анализ структуры липаз бактерий рода *Geobacillus* и выявление мотивов, влияющих на их термостабильность // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – № 4/1. – с. 666-674.
5. Abe F., Minegishi H., Miura T., Nagahama T., Usami R., Horikoshi K. Characterization of Cold- and High-Pressure-Active Polygalacturonases from a Deep-Sea Yeast, *Cryptococcus liquefaciens* Strain N6 // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2006. – V. 70(1). – p. 296-299.
6. Adcock S. A., McCammon J. A. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins // Chemical reviews. – 2006. – V. 106(5). – p. 1589-1615.
7. Alazard D., Dukan S., Urios A., Verhe F., Bouabida N., Morel F., Thomas P, Garcia J.L., Ollivier B. *Desulfovibrio hydrothermalis* sp nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from hydrothermal vents // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2003. – V. 53(1). – p. 173-178.
8. Alpas H., Lee J., Bozoglu F., Kaletunc G. Evaluation of high hydrostatic pressure sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7 by differential scanning calorimetry // International journal of food microbiology. – 2003. – V. 87(3). – p. 229-237.
9. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. - 1990. – V. 215. – p. 403–410.

10. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucleic acids research*. – 1997. – V. 25(17). – p. 3389-3402.
11. Aluwihare L.I., Repeta D.J., Chen R.F. Chemical composition and cycling of dissolved organic matter in the Mid-Atlantic Bight. *Deep-Sea Res Part II // Topical Studies in Oceanography*. – 2002. – V. 49(20). – p. 4421-4437.
12. Aluwihare L.I., Repeta D.J., Pantoja S., Johnson C.G. Two chemically distinct pools of organic nitrogen accumulate in the ocean // *Science*. – 2005. – V. 308. – p. 1007-1010.
13. Aravind L., Koonin E.V. Novel predicted RNA-binding domains associated with the translation machinery // *Journal of molecular evolution*. – 1999. – V. 48(3). – p. 291-302.
14. Atomi H., Fukui T., Kanai T., Morikawa M., Imanaka T. Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1 // *Archaea*. – 2004. – V. 1(4). – p. 263-267.
15. Balny C. What lies in the future of high-pressure bioscience? // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. – 2006. – V. 1764(3). – p. 632-639.
16. Balny C., Masson P., Heremans K. High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. – 2002. – V. 1595(1). – p. 3-10.
17. Baross J.A., Deming J.W. Deep-sea smokers: windows to a subsurface biosphere? // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 1993. – V. 57(14). – p. 3219-3230.
18. Bartlett D.H. Microbial life at high-pressures // *Science progress*. – 1991. – V. 76(301-302) – p. 479-496.
19. Bartlett D.H. Pressure effects on *in vivo* microbial processes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. – 2002. – V. 1595(1). – p. 367-381.
20. Bartlett D.H., Kato C., Horikoshi K. High pressure influences on gene and protein expression // *Research in Microbiology*. – 1995. – V. 146(8). – p. 697-706.
21. Barlow D.J., Thornton J.M. Ion-pairs in proteins // *Journal of molecular biology*. – 1983. – V. 168(4). – p. 867-885.
22. Bassler J., Grandi P., Gadal O., Lessmann T., Petfalski E., Tollervey D., Lechner J., Hurt E. Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export // *Molecular cell*. – 2001. – V. 8(3). – p. 517-529.
23. Berendsen H. J. C., Postma J. P. M., van Gunsteren W. F., DiNola A., Haak J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath // *The Journal of chemical physics*. – 1984. – V. 81(8). – p. 3684-3690.

24. Berezovsky I.N., Zeldovich K.B., Shakhnovich E.I. Positive and negative design in stability and thermal adaptation of natural proteins // PLoS computational biology. – 2007. – V. 3(3). – p. e52.
25. Berhanu W.M., Hansmann U.H. Side-chain hydrophobicity and the stability of A $\beta$ 16-22 aggregates // Protein Science. – 2012. – V. 21(12). – p. 1837-1848.
26. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank // Nucleic acids research. – 2000. – V. 28(1). – p. 235-242.
27. Bharatham K., Zhang Z. H., Mihalek I. Determinants, discriminants, conserved residues-a heuristic approach to detection of functional divergence in protein families // PloS one. – 2011. – V. 6(9). – p. e24382.
28. Birrien J. L., Zeng X., Jebbar M., Cambon-Bonavita M-A., Quéréllou J., Oger P., Biennu N., Xiao X., Prieur D. *Pyrococcus yayanosii* sp. nov., an obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2011. – V. 61(12). – p. 2827-2881.
29. Blackburn N., Fenchel T., Mitchell J. Microscale nutrient patches in planktonic habitats shown by chemotactic bacteria // Science. – 1998. – V. 282(5397). – p. 2254-2256.
30. Boehr D.D., Nussinov R., Wright P.E. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition // Nature chemical biology. – 2009. – V. 5(11). – p. 789-796.
31. Boehr D.D. Promiscuity in protein-RNA interactions: Conformational ensembles facilitate molecular recognition in the spliceosome // Bioessays. – 2012. – V. 34(3). – p. 174-180.
32. Bowman G. R., Voelz V. A., Pande V. S. Taming the complexity of protein folding // Current opinion in structural biology. – 2011. – V. 21(1). – p. 4-11.
33. Brandes J.A., Boctor N.Z., Cody G.D., Cooper B.A., Hazen R.M., Yoder H.S. Abiotic nitrogen reduction on the early Earth // Nature. – 1998. – V. 395(6700). – p. 365-367.
34. Breg J.N., van Opheusden J.H.J., Burgering M.J.M., Boelens R., Kaptein R. Structure of Arc Repressor in solution: evidence for a family of beta-sheet DNA-binding proteins // Nature. – 1990. – V.346. – p. 586–589.
35. Breyer M. D., Breyer R. M. G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney // Annual Review of Physiology. – 2001. – V. 63(1). – p. 579-605.
36. Brock T.D. Life at high temperatures. Evolutionary, ecological, and biochemical significance of organisms living in hot springs is discussed // Science. – 1967. – V. 158(3804). – p. 1012-1019.
37. Brock T.D., Mercedes R. E. Fine Structure of *Thermus aquaticus*, an Extreme Thermophile // Journal of bacteriology. – 1970. – V. 104(1). – p. 509-517.

38. Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M. CHARMM: a program for macromolecular energy minimization and dynamics calculations // *Journal of computational chemistry*. – 1983. – V. 4(2). – p. 187-217.
39. Brown P., Meyer R., Cardone F., Pocchiari M. Ultra-high-pressure inactivation of prion infectivity in processed meat: a practical method to prevent human infection // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – V. 100(10). – p. 6093-6097.
40. Brown C., Campos-León K., Strickland M., Williams C., Fairweather V., Brady R.L., Gaston K. Protein flexibility directs DNA recognition by the papillomavirus E2 proteins // *Nucleic acids research*. – 2011. – V. 39(7). – p. 2969-2980.
41. Bull A.T., Ward A.C., Goodfellow M. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2000. – V. 64(3). – p. 573-606.
42. Bult C.J., White O., Olsen G.J., Zhou L., Fleischmann R.D., Sutton G.G., Blake J.A., FitzGerald L.M., Clayton R.A., Gocayne J.D. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii* // *Science*. – 1996. – V. 273(5278). – p. 1058-1073.
43. Burggraf S., Jannasch H. W., Nicolaus B., Stetter K. O. *Archaeoglobus profundus* sp. nov., Represents a New Species within the Sulfate-reducing Archaeobacteria // *Systematic and Applied Microbiology*. – 1990. – V. 13(1). – p. 24-28.
44. Caffarena E.R., Grigera J.R. On the hydrogen bond structure of water at different densities // *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*. – 2004. – V. 342(1). – p. 34-39.
45. Calandrini V., Kneller G.R. Influence of pressure on the slow and fast fractional relaxation dynamics in lysozyme: A simulation study // *The Journal of chemical physics*. – 2008. – V. 128(6). – p. 065102.
46. Campanaro S., Vezzi A., Vitulo N., Lauro F.M., D'Angelo M., Simonato F., Cestaro A., Malacrida G., Bertoloni G., Valle G. Laterally transferred elements and high pressure adaptation in *Photobacterium profundum* strains // *BMC genomics*. – 2005. – V. 6(1). – p. 122.
47. Capece L., Marti M.A., Bidon Chanal A., Nadra A., Luque F.J., Estrin D.A. High pressure reveals structural determinants for globin hexacoordination: neuroglobin and myoglobin cases // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2009. – V. 75(4). – p. 885-894.
48. Capra J.A., Singh M. Characterization and prediction of residues determining protein functional specificity // *Bioinformatics*. – 2008. – V. 24(13). – p. 1473-1480.
49. Chakraborty A., Chakrabarti S. A survey on prediction of specificity-determining sites in proteins // *Briefings in bioinformatics*. – 2014. – p. bbt092.

50. Chipot C., Pearlman D. A. Free energy calculations. The long and winding gilded road // Molecular Simulation. – 2002. – V. 28(1-2). – p. 1-12.
51. Chong P.L.G., Ravindra R., Khurana M., English V., Winter R. Pressure perturbation and differential scanning calorimetric studies of bipolar tetraether liposomes derived from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* // Biophysical journal. – 2005. – V. 89(3). – p. 1841-1849.
52. Cioni P., Strambini G.B. Pressure/temperature effects on protein flexibility from acrylamide quenching of protein phosphorescence // Journal of molecular biology. – 1999. – V. 291(4). – p. 955-964.
53. Cioni P., Gabellieri E. Protein dynamics and pressure: What can high pressure tell us about protein structural flexibility? // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. – 2011. – V. 1814(8). – p. 934-941.
54. Collins K., Mitchell J.R. Telomerase in the human organism // Oncogene. – 2002. – V. 21(4). – p. 564-579.
55. Collins M.D., Hummer G., Quillin M.L., Matthews B.W., Gruner S.M. Cooperative water filling of a nonpolar protein cavity observed by high-pressure crystallography and simulation // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2005. – V. 102(46). – p. 16668-16671.
56. Coltri P., Guimaraes B., Garanto D., Luz J. Structural Insights into the Interaction of the Nip7 PUA Domain with Polyuridine RNA // Biochemistry. – 2007. – V. 46(49). – p. 14177-14187.
57. Connors S.B., Mongodin E.F., Johnson M.R., Montero C.I., Nelson K.E., Kelly R.M. Microbial biochemistry, physiology, and biotechnology of hyperthermophilic *Thermotoga* species // FEMS microbiology reviews. – 2006. – V. 30(6). – p. 872-905.
58. Cossins A.R., Bowler K. Temperature Biology of Animals. – Chapman and Hall, 1987. – p.339.
59. Dahlhoff E.P., Somero G.N. Kinetic and structural adaptations of cytosolic malate dehydrogenases of eastern Pacific abalones (genus *Haliotis*) from different thermal habitats: biochemical correlates of biogeographical patterning // Journal of experimental biology. – 1993. – V. 185(1). – p. 137-150.
60. Daniel I., Oger P., Winter R. Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions // Chemical Society Reviews. – 2006. – V. 35(10). – p. 858-875.
61. Daniel R. M., Dines M., Petach H. H. The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures // Biochem. J. – 1996. – V. 317. – p. 1-11.

62. Davidovic M., Mattea C., Qvist J., Halle B. Protein cold denaturation as seen from the solvent // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – V. 131(3). – p. 1025-1036.
63. DeLong E.F., Yayanos A.A. Biochemical function and ecological significance of novel bacterial lipids in deep-sea prokaryotes // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1986. – V. 51(4). – p. 730-737.
64. DeLong E.F., Franks D.G., Yayanos A.A. Evolutionary relationships of cultivated psychrophilic and barophilic deep-sea bacteria // *Applied and environmental microbiology*. – 1997. – V. 63(5). – p. 2105-2108.
65. Di Giulio M. A comparison of proteins from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus abyssi*: barophily in the physicochemical properties of amino acids and in the genetic code // *Gene*. – 2005. – V. 346. – p. 1-6.
66. Doster W., Petry W., Schober H. High pressure – unfolding of myoglobin studied by dynamic neutron scattering // *Chemical physics*. – 2003. – V. 292(2). – p. 383-387.
67. Drummond D.A., Wilke C.O. Mistranslation-induced protein misfolding as a dominant constraint on coding-sequence evolution // *Cell*. – 2008. – V. 134(2). – p. 341-352.
68. Drummond D.A., Wilke C.O. The evolutionary consequences of erroneous protein synthesis // *Nature Reviews Genetics*. – 2009. – V. 10(10). – p. 715-724.
69. Duan Y., Kollman P.A. Pathways to a protein folding intermediate observed in a 1-microsecond simulation in aqueous solution // *Science*. – 1998. – V. 282(5389). – p. 740-744.
70. Dubins D.N., Lee A., Macgregor R.B., Chalikian T.V. On the stability of double stranded nucleic acids // *Journal of the American Chemical Society*. – 2001. – V. 123(38). – p. 9254-9259.
71. Durrant J. D., McCammon J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery // *BMC biology*. – 2011. – V. 9(1). – p. 71.
72. Dzwolak W., Kato M., Taniguchi Y. Fourier transform infrared spectroscopy in high-pressure studies on proteins // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. – 2002. – V. 1595(1). – p. 131-144.
73. Eloë E.A., Lauro F.M., Vogel R.F., Bartlett D.H. The deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 utilizes separate flagellar systems for swimming and swarming under high-pressure conditions // *Applied and environmental microbiology*. – 2008. – V. 74(20). – p. 6298-6305.
74. Erauso G., Reysenbach A-L., Godfroy A., Meunier J-R., Crump B., Partensky F, Baross J. A., Marteinson V., Barbier G., Pace N. R., Prieur D. *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new

- hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent // Archives of Microbiology. – 1993. – V. 160(5). – p. 338-349.
75. Evguenieva-Hackenberg E. The archaeal exosome // RNA Exosome. – Springer US, 2010. – p. 29-38.
76. Fabry S., Lehmacher A., Bode W., Hensel R. Expression of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from the extremely thermophilic archaeobacterium *Methanothermus fervidus* in *E. coli*. Enzyme purification, crystallization, and preliminary crystal data // FEBS letters. – 1988. – V. 237(1). – p. 213-217.
77. Ferrara G., McCarthy A.N., Grigera J.R. Clustering of Lennard-Jones particles in water: Temperature and pressure effects // The Journal of chemical physics. – 2007. – V. 127(10). – p. 104502.
78. Ferrara C.G., Ghara O., Grigera J.R. Aggregation of nonpolar solutes in water at different pressures and temperatures: the role of hydrophobic interaction // The Journal of chemical physics. – 2012. – V. 137(13). – p. 135104.
79. Ferreira E., Mendes Y.S., Silva J.L., Galler R., Oliveira A.C., Freire M.S., Gaspar L.P. Effects of hydrostatic pressure on the stability and thermostability of poliovirus: a new method for vaccine preservation // Vaccine. – 2009. – V. 27(39). – p. 5332-5337.
80. Fiala G., Stetter K.O. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100C // Archives of Microbiology. – 1986. – V. 145(1). – p. 56-61.
81. Finn R.D., Mistry J., Schuster-Bockler B., Griffiths-Jones S., Hollich V., Lassmann T., Moxon S., Marshall M., Khanna A., Durbin R. Pfam: clans, web tools and services // Nucleic acids research. – 2006. – V. 34(1). – p. D247-D251.
82. Fong J.H., Shoemaker B.A., Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V. Intrinsic Disorder in Protein Interactions: Insights From a Comprehensive Structural Analysis // PLoS computational biology. – 2009. – V. 5(3). – p. e1000316.
83. Friedman H. L. CV Krishnan in F. Franks (Ed.), Water, A Comprehensive Treatise, Vol. 3. – 1973.
84. Frock A.D., Kelly R.M. Extreme thermophiles: moving beyond single-enzyme biocatalysis // Current opinion in chemical engineering. – 2012. – V. 1(4). – p. 363-372.
85. Fukui T., Atomi H., Kanai T., Matsumi R., Fujiwara S., Imanaka T. Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes // Genome research. – 2005. – V. 15(3). – p. 352-363.

86. Garcia-Boronat M., Diez-Rivero C.M., Reinherz E.L., Reche P.A. PVS: a web server for protein sequence variability analysis tuned to facilitate conserved epitope discovery // *Nucleic acids research*. – 2008. – V. 36(2). – p. W35-W41.
87. González J. M., Masuchi Y., Robb F. T., Ammerman J. W., Maeder D. L., Yanagibayashi M., Tamaoka J., Kato C. *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough // *Extremophiles*. – 1998. – V. 2(2). – p. 123-130.
88. Gross M., Jaenicke R. Pressure-induced dissociation of tight couple ribosomes // *FEBS letters*. – 1990. – V. 267(2). – p. 239-241.
89. Gross M., Lehle K., Jaenicke R., Nierhaus K.H. Pressureinduced dissociation of ribosomes and elongation cycle intermediates. Stabilizing conditions and identification of the most sensitive functional state // *European Journal of Biochemistry*. – 1993. – V. 218(2). – p. 463-468.
90. Grossart H.P., Riemann L., Azam F. Bacterial motility in the sea and its ecological implications // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2001. – V. 25(3). – p. 247-258.
91. Gunbin K.V., Afonnikov D.A., Kolchanov N.A. Molecular evolution of the hyperthermophilic archaea of the *Pyrococcus* genus: analysis of adaptation to different environmental conditions // *BMC genomics*. – 2009. – V. 10(1). – p. 639.
92. Gutgsell N., Englund N., Niu L., Kaya Y., Lane B.G., Ofengand J. Deletion of the *Escherichia coli* pseudouridine synthase gene TruB blocks formation of pseudouridine 55 in tRNA in vivo, does not affect exponential growth, but confers a strong selective disadvantage in competition with wild-type cells // *RNA*. – 2000. – V. 6(12). – p. 1870-1881.
93. Hafenbradl D., Keller M., Dirmeier R., Rachel R., Roßnagel P., Burggraf S., Huber H., Stetter K. O. *Ferroglobus placidus* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe<sup>2+</sup> at neutral pH under anoxic conditions // *Archives of Microbiology*. – 1996. – V. 166(5). – p. 308-314.
94. Hamma T., Ferre-D'Amare A.R. Pseudouridine synthases // *Chemistry & biology*. – 2006. – V. 13(11). – p. 1125-1135.
95. Harries D., Rau D.C., Parsegian V.A. Solutes probe hydration in specific association of cyclodextrin and adamantane // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – V. 127(7). – p. 2184-2190.
96. Hazel J.R., Prosser C.L. Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms // *Physiol. Rev.* – 1974. – V. 54(3). – p. 620-677.

97. Hazen R., Boctor N., Brandes J., Cody G., Hemley R. High pressure and the origin of life // *Journal of Physics: Condensed Matter*. – 2002. – V. 14(44). – p. 11489.
98. Heiss N.S., Knight S.W., Vulliamy T.J., Klauck S.M., Wiemann S., Mason P.J., Poustka A., Dokal I. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions // *Nature genetics*. – 1998. – T. 19.
99. Hesling C., Oliveirab C.C, Castilhoc B.A., Zanchin N.I.T. The Shwachman–Bodian–Diamond syndrome associated protein interacts with HsNip7 and its down-regulation affects gene expression at the transcriptional and translational levels // *Experimental cell research*. – 2007. – V. 313(20). – p. 4180-4195.
100. Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M. LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations // *Journal of computational chemistry*. – 1997. – V. 18(12). – p. 1463-1472.
101. Hong S-I., Pyunb Y-R. Membrane damage and enzyme inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure CO treatment // *International Journal of Food Microbiology*. – 2001. – V. 63(1). – p. 19-28.
102. Hormann S., Scheyhing C., Behr J., Pavlovic M., Ehrmann M., Vogel R.F. Comparative proteome approach to characterize the high-pressure stress response of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451 // *Proteomics*. – 2006. – V. 6(6). – p. 1878-1885.
103. Hummer G., Garde S., Garcia A. E., Paulaitis M. E., Pratt L. R. The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – V. 95(4). – p. 1552-1555.
104. Ikegami A., Nakasone K., Kato C., Nakamura Y., Horikoshi K. Glutamine synthetase gene expression at elevated hydrostatic pressure in a deep-sea piezophilic *Shewanella violacea* // *FEMS microbiology letters*. – 2000. – V. 192(1). – p. 91-95.
105. Ishii A., Oshima T., Sato T., Nakasone K., Mori H., Kato C. Analysis of hydrostatic pressure effects on transcription in *Escherichia coli* by DNA microarray procedure // *Extremophiles*. – 2005. – V. 9(1). – p. 65-73.
106. Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Kijimoto T, Nameki N, Watanabe M, Kondo H, Sekine M, Okada N, Nishimura S. Crystal structure of archaeosine tRNA-guanine transglycosylase // *Journal of molecular biology*. – 2002. – V. 318(3). – p. 665-677.
107. Ivanisenko V. A., Eroshkin A. M., Kolchanov N. A. WebProAnalyst: an interactive tool for analysis of quantitative structure–activity relationships in protein families // *Nucleic acids research*. – 2005. – V. 33(2). – p. W99-W104.

108. Jaenicke R. Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies // *Biochemistry*. – 1991. – V. 30(13). – p. 3147-3161.
109. Jaenicke R., Böhm G. The stability of proteins in extreme environments // *Current opinion in structural biology*. – 1998. – V. 8(6). – p. 738-748.
110. Janin J., Sternberg M.J. Protein flexibility, not disorder, is intrinsic to molecular recognition // *F1000 biology reports*. – 2013. – T. 5.
111. Jannasch H.W., Taylor C.D. Deep-sea microbiology // *Annual Reviews in Microbiology*. – 1984. – V. 38(1). – p. 487-487.
112. Jeanthon C., L'Haridon S., Reysenbach A. L., Vernet M., Messner P., Sleytr U. B., Prieur D. *Methanococcus infernus* sp. nov., a novel hyperthermophilic lithotrophic methanogen isolated from a deep-sea hydrothermal vent // *International journal of systematic bacteriology*. – 1998. – V. 48(3). – p. 913-919.
113. Jeanthon C., L'Haridon S., Reysenbach A.-L., Corre E., Vernet M., Messner P., Sleytr U. B., Prieur D. *Methanococcus vulcanius* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from East Pacific Rise, and identification of *Methanococcus* sp. DSM 4213Tas *Methanococcus fervens* sp. nov // *International journal of systematic bacteriology*. – 1999. – V. 49(2). – p. 583-589.
114. Jiao D., Zhang J., Duke R.E., Li G., Schnieders M.J., Ren P. Trypsin-ligand binding free energies from explicit and implicit solvent simulations with polarizable potential // *Journal of computational chemistry*. – 2009. – V. 30(11). – p. 1701-1711.
115. Jolivet E., L'Haridon S., Corre E., Forterre P., Prieur D. *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2003. – V. 53(3). – p. 847-851.
116. Jollivet D., Mary J., Gagnie`re N., Tanguy A., Fontanillas E. Proteome Adaptation to High Temperatures in the Ectothermic Hydrothermal Vent Pompeii Worm // *PloS One*. – 2012. – V. 7(2). – p. e31150.
117. Jonas J., Jonas A. High-pressure NMR spectroscopy of proteins and membranes // *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. – 1994. – V. 23(1). – p. 287-318.
118. Jones W. J., Paynter M. J. B., Gupta R. Characterization of *Methanococcus maripaludis* sp. nov., a new methanogen isolated from salt marsh sediment // *Archives of microbiology*. – 1983. – V. 135(2). – p. 91-97.
119. Jones W.J., Whitman W.B., Fields R.D., Wolfe R.S. Growth and Plating Efficiency of *Methanococci* on Agar Media // *Applied and environmental microbiology*. – 1983. – V. 46(1). – p. 220-226.

120. Jones W.J., Leigh J.A., Mayer F., Woese C.R., Wolfe R.S. *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent // Archives of Microbiology. – 1983. – V. 136(4). – p. 254-261.
121. Jung J. H., Lee J-H., Holden J. F., Seo D-H., Shin H., Kim H-Y., Kim W., Ryu S., Parka C-S. Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. strain ST04, isolated from a deep-sea hydrothermal sulfide chimney on the Juan de Fuca Ridge // Journal of bacteriology. – 2012. – V. 194(16). – p. 4434-4435.
122. Kabsch W., Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features // Biopolymers. – 1983. – V. 22(12). – p. 2577-2637.
123. Kalinina O.V., Mironov A.A., Gelfand M.S., Rakhmaninova A.B. Automated selection of positions determining functional specificity of proteins by comparative analysis of orthologous groups in protein families // Protein Science. – 2004. – V. 13(2). – p. 443-456.
124. Kalodimos C.G., Biris N., Bonvin A.M., Levandoski M.M., Guennuegues M., Boelens R., Kaptein R. Structure and flexibility adaptation in nonspecific and specific protein-DNA complexes // Science. – 2004. – V. 305(5682). – p. 386-389.
125. Kaminski G.A., Friesner R.A., Zhou R. A computationally inexpensive modification of the point dipole electrostatic polarization model for molecular simulations // Journal of computational chemistry. – 2003. – V. 24(3). – p. 267-276.
126. Karplus M., Kuriyan J. Molecular dynamics and protein function // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2005. – V. 102(19). – p. 6679-6685.
127. Karplus M., McCammon J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules // Nature Structural & Molecular Biology. – 2002. – V. 9(9). – p. 646-652.
128. Katti S.K., LeMaster D.M., Eklund H. Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution // Journal of molecular biology. – 1990. – V. 212(1). – p. 167-184.
129. Kawano H., Nakasone K., Abe F., Chiaki K., Horikoshi K. Protein-DNA Interactions under High-Pressure Conditions, Studied by Capillary Narrow-Tube Electrophoresis // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2005. – V. 69(7). – p. 1415-1417.
130. Kendall M. G. The advanced theory of statistics // The advanced theory of statistics. – 1946. – №. 2nd Ed.
131. Kendall M. M., Liu Y., Sieprawska-Lupa M., Stetter K. O., Whitman W. B., Boone D. R. *Methanococcus aeolicus* sp. nov., a mesophilic, methanogenic archaeon from shallow and deep marine sediments // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2006. – V. 56(7). – p. 1525-1529.

132. Knapp S., Karshikoff A., Berndt K.D., Christova P., Atanasov B., Ladenstein R. Thermal unfolding of the DNA-binding protein Sso7d from the hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus* // Journal of molecular biology. – 1996. – V. 264(5). – p. 1132-1144.
133. Kony D., Damm W., Stoll S., Van Gunsteren W.F. An improved OPLS-AA force field for carbohydrates // Journal of computational chemistry. – 2002. – V. 23(15). – p. 1416-1429.
134. Kumar N., Shukla S., Kumar S., Suryawanshi A., Chaudhry U., Ramachandran S., Maiti S. Intrinsically disordered protein from a pathogenic mesophile *Mycobacterium tuberculosis* adopts structured conformation at high temperature // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 2008. – V. 71(3). – p. 1123-1133.
135. Kurr M., Huber R., König H., Jannasch H. W., Fricke H., Trincone A., Kristjansson J. K., Stetter K. O. *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110 C // Archives of Microbiology. – 1991. – V. 156(4). – p. 239-247.
136. Lam S.Y., Yeung R.C., Yu T.H., Sze K.H., Wong K.B. A rigidifying salt-bridge favors the activity of thermophilic enzyme at high temperatures at the expense of low-temperature activity // PLoS biology. – 2011. – V. 9(3). – p. e1001027.
137. Laurent A.D., Mironov V.A., Chapagain P.P., Nemukhin A.V., Krylov A.I. Exploring structural and optical properties of fluorescent proteins by squeezing: modeling high-pressure effects on the mStrawberry and mCherry red fluorescent proteins // The Journal of Physical Chemistry B. – 2012. – V. 116(41). – p. 12426-12440.
138. Lauro F.M., Bartlett D.H. Prokaryotic lifestyles in deep sea habitats // Extremophiles. – 2008. – V. 12(1). – p. 15-25.
139. Lauro F.M., Chastain R.A., Blankenship L.E., Yayanos A.A., Bartlett D.H. The unique 16S rRNA genes of piezophiles reflect both phylogeny and adaptation // Applied and environmental microbiology. – 2007. – V. 73(3). – p. 838-845.
140. Lazaridis T., Lee I., Karplus M. Dynamics and unfolding pathways of a hyperthermophilic and a mesophilic rubredoxin // Protein science. – 1997. – V. 6(12). – p. 2589-2605.
141. Lee K. J. Molecular Dynamics Simulations of a Hyperthermophilic and a Mesophilic Protein L30e // Journal of chemical information and modeling. – 2011. – V. 52(1). – p. 7-15.
142. Lee H. S., Bae S. S., Kim M-S., Kwon K. K., Kang S.G., Lee J-H. Complete Genome Sequence of Hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. NA2 Isolated from Deep-sea Hydrothermal Vent Area // Journal of bacteriology. – 2011. – p. JB. 05150-11.

143. Li Y., MacKerell A.D. Jr, Egorin M.J., Ballesteros M.F., Rosen D.M., Wu Y.Y., Blamble D.A., Callery P.S. Comparative molecular field analysis-based predictive model of structure-function relationships of polyamine transport inhibitors in L1210 cells // *Cancer research*. – 1997. – V. 57(2). – p. 234-239.
144. Liang H-K., Huang Ch-M., Ko M-T., Hwang J-K. Amino acid coupling patterns in thermophilic proteins // *Proteins*. – 2005. – V. 59. – p. 58–63.
145. Liszka M. J., Clark M. E., Schneider E., Clark D. S. Nature versus nurture: developing enzymes that function under extreme conditions // *Annual review of chemical and biomolecular engineering*. – 2012. – V. 3. – p. 77-102.
146. Liu M., He H., Su J. Is it possible to stabilize a thermophilic protein further using sequences and structures of mesophilic proteins: a theoretical case study concerning DgAS // *Theoretical Biology and Medical Modelling*. – 2013. – V. 10(1). – p. 26.
147. Lobkovsky A.E., Wolf Y.I., Koonin E.V. Universal distribution of protein evolution rates as a consequence of protein folding physics // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – V. 107(7). – p. 2983-2988.
148. Lü Z., Lu Y. *Methanocella conradii* sp. nov., a thermophilic, obligate hydrogenotrophic methanogen, isolated from Chinese rice field soil // *PloS one*. – 2012. – V. 7(4). – p. e35279.
149. Luz J.S., Ramos C.R., Santos M.C., Coltri P.P., Palhano F.L., Foguel D., Oliveira C.C. Identification of archaeal proteins that affect the exosome function in vitro // *BMC biochemistry*. – 2010. – V. 11(1). – p. 22.
150. Makarova K. S., Wolf Y. I., Koonin E. V. Potential genomic determinants of hyperthermophily // *Trends in Genetics*. – 2003. – V. 19(4). – p. 172-176.
151. Marteinsson V. T., Birrien J-L., Reysenbach A-L., Vernet M., Marie D., Gambacorta A., Messner P., Sleytr U. B., Prieur D. *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent // *International journal of systematic bacteriology*. – 1999. – V. 49(2). – p. 351-359.
152. Martinez R., Schwaneberg U., Roccatano D. Temperature effects on structure and dynamics of the psychrophilic protease subtilisin S41 and its thermostable mutants in solution // *Protein Engineering Design and Selection*. – 2011. – V. 24(7). – p. 533-544.
153. McCarthy A.N., Grigera J.R. Effect of pressure on the conformation of proteins. A molecular dynamics simulation of lysozyme // *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. – 2006. – V. 24(4). – p. 254-261.

154. McCrary B.S., Edmondson S.P., Shriver J.W. Hyperthermophile protein folding thermodynamics: differential scanning calorimetry and chemical denaturation of Sac7d // *Journal of molecular biology*. – 1996. – V. 264(4). – p. 784-805.
155. McDonald J.H. Temperature Adaptation at Homologous Sites in Proteins from Nine Thermophile–Mesophile Species Pairs // *Genome biology and evolution*. – 2010. – V. 2 – p. 267-276.
156. McFall-Ngai M., Horwitz J. A comparative study of the thermal stability of the vertebrate eye lens: Antarctic fish to the desert iguana // *Experimental eye research*. – 1990. – V. 50(6). – p. 703-709.
157. McQuarrie D.A. *Statistical Mechanics* Harper & // New York. – 1976.
158. Meersman F., Wang J., Wu Y., Heremans K. Pressure effect on the hydration properties of poly (N-isopropylacrylamide) in aqueous solution studied by FTIR spectroscopy // *Macromolecules*. – 2005. – V. 38(21). – p. 8923-8928.
159. Merkley E.D., Daggett V., Parson W.W. A temperature-dependent conformational change of NADH oxidase from *Thermus thermophilus* HB8 // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2012. – V. 80(2). – p. 546-555.
160. Miller S.L., Lazcano A. The origin of life--did it occur at high temperatures? // *Journal of molecular evolution*. – 1995. – V. 41(6). – p. 689-692.
161. Miroshnichenko M. L., Hippe H., Stackebrandt E., Kostrikina N. A., Chernyh N. A., Jeanthon C., Nazina T. N., Belyaev S. S., Bonch-Osmolovskaya E. A. Isolation and characterization of *Thermococcus sibiricus* sp. nov. from a Western Siberia high-temperature oil reservoir // *Extremophiles*. – 2001. – V. 5(2). – p. 85-91.
162. Montoro A. G., Ramirez S. C., Quiroga R., Taubas J. V. Specificity of transmembrane protein palmitoylation in yeast // *PloS one*. – 2011. – V. 6(2). – p. e16969.
163. Mozhaev V.V., Heremans K., Frank J., Masson P., Balny C. High pressure effects on protein structure and function // *Proteins-Structure Function and Genetics*. – 1996. – V. 24(1). – p. 81-91.
164. Neuner A., Jannasch H. W., Belkin S., Stetter K. O. *Thermococcus litoralis* sp. nov.: a new species of extremely thermophilic marine archaeobacteria // *Archives of microbiology*. – 1990. – V. 153(2). – p. 205-207.
165. Nicastro G., de Chiara C., Pedone E., Rossi M., Bartolucci S. NMR solution structure of a novel thioredoxin from *Bacillus acidocaldarius* possible determinants of protein stability // *European Journal of Biochemistry*. – 2000. – V. 267(2). – p. 403-413.
166. Oger P., Sokolova T. G., Kozhevnikova D. A., Chernyh N. A., Bartlett D. H., Bonch-Osmolovskaya E. A., Lebedinsky A. V. Complete genome sequence of the

- hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. strain AM4, capable of organotrophic growth and growth at the expense of hydrogenogenic or sulfidogenic oxidation of carbon monoxide // *Journal of bacteriology*. – 2011. – V. 193(24). – p. 7019-7020.
167. Ogunmola G.B., Zipp A., Chen F., Kauzmann W. Effects of pressure on visible spectra of complexes of myoglobin, hemoglobin, cytochrome c, and horse radish peroxidase // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1977. – V. 74(1). – p. 1-4.
168. Paci E., Marchi M. Intrinsic compressibility and volume compression in solvated proteins by molecular dynamics simulation at high pressure // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – V. 93(21). – p. 11609-11614.
169. Paiardini A., Sali R., Bossa F., Pascarella S. "Hot cores" in proteins: Comparative analysis of the apolar contact area in structures from hyper/thermophilic and mesophilic organisms // *BMC structural biology*. – 2008. – V. 8(1). – p. 1-18.
170. Panick G., Malessa R., Winter R., Rapp G., Frye K.J., Royer C.A. Structural Characterization of the Pressure-denatured State and Unfolding/Refolding Kinetics of Staphylococcal Nuclease by Synchrotron Small-angle X-ray Scattering and Fourier-transform Infrared Spectroscopy // *Journal of molecular biology*. – 1998. – V. 275(2). – p. 389-402.
171. Parrinello M., Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method // *Journal of Applied physics*. – 1981. – V. 52(12). – p. 7182-7190.
172. Paschek D. Temperature dependence of the hydrophobic hydration and interaction of simple solutes: An examination of five popular water models // *The Journal of chemical physics*. – 2004. – V. 120(14). – p. 6674-6690.
173. Paschek D., Nonn S., Geiger A. Low-temperature and high-pressure induced swelling of a hydrophobic polymer-chain in aqueous solution // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2005. – V. 7(14). – p. 2780-2786.
174. Pei J., Kim B.H., Grishin N.V. PROMALS3D: a tool for multiple sequence and structure alignment // *Nucleic acids research*. – 2008. – V. 36(7). – p. 2295-2300.
175. Perez-Arellano I., Gallego J., Cervera J. The PUA domain – a structural and functional overview // *FEBS journal*. – 2007. – V. 274(19). – p. 4972-4984.
176. Perrier-Cornet J.-M., Hayert M., Gervais P. Yeast cell mortality related to a high-pressure shift: occurrence of cell membrane permeabilization // *Journal of applied microbiology*. – 1999. – V. 87(1). – p. 1-7.
177. Pfeil W. Stability and co-operative properties of partially folded proteins // *Biochemistry. Biokhimiia*. – 1998. – V. 63(3). – p. 294-302.

178. Pieper U., Webb B.M., Barkan D.T., Schneidman-Duhovny D., Schlessinger A., Braberg H., Yang Z., Meng E.C., Pettersen E.F., Huang C.C., Datta R.S., Sampathkumar P., Madhusudhan M.S., Sjölander K., Ferrin T.E., Burley S.K., Sali A. ModBase, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources // *Nucleic acids research*. – 2011. – V. 39(1). – p. D465-D474.
179. Pirovano W., Feenstra K. A., Heringa J. Sequence comparison by sequence harmony identifies subtype-specific functional sites // *Nucleic acids research*. – 2006. – V. 34(22). – p. 6540-6548.
180. Plaza del Pino I.M., Ibarra-Molero B., Sanchez-Ruiz J.M. Lower kinetic limit to protein thermal stability: a proposal regarding protein stability in vivo and its relation with misfolding diseases // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2000. – V. 40(1). – p. 58-70.
181. Podar M., Reysenbach A. L. New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles // *Current opinion in biotechnology*. – 2006. – V. 17(3). – p. 250-255.
182. Polyansky A., Kosinsky Y., Efremov R. Correlation of Local Changes in the Temperature-Dependent Conformational Flexibility of Thioredoxins with Their Thermostability // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2004. – V. 30(5). – p. 421-430.
183. Porollo A., Meller J. Prediction-based Fingerprints of Protein-Protein Interactions // *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. – 2007. – V. 66(3). – p. 630-645.
184. Privalov P.L., Gill S. The hydrophobic effect: a reappraisal // *Pure and Applied Chemistry*. – 1989. – V. 61(6). – p. 1097-1104.
185. Priyakumar U.D., Ramakrishna S., Nagarjuna K.R., Reddy S.K. Structural and energetic determinants of thermal stability and hierarchical unfolding pathways of hyperthermophilic proteins, Sac7d and Sso7d // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2010. – V. 114(4). – p. 1707-1718.
186. Prokofeva M. I., Kostrikina N. A., Kolganova T. V., Tourova T. P., Lysenko A. M., Lebedinsky A. V., Bonch-Osmolovskaya E. A. Isolation of the anaerobic thermoacidophilic crenarchaeote *Acidilobus saccharovorans* sp. nov. and proposal of Acidilobales ord. nov., including *Acidilobaceae* fam. nov. and *Caldisphaeraceae* fam. nov // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2009. – V. 59(12). – p. 3116-3122.
187. Reysenbach A., Shock E. Merging Genomes with Geochemistry in Hydrothermal Ecosystems // *Science*. – 2002. – V. 296(5570). – p. 1077-1082.

188. Reinert L.S., Shi B., Nandi S., Mazan-Mamczarz K., Vitolo M., Bachman K.E., He H., Gartenhaus R.B. MCT- 1 protein interacts with the cap complex and modulates messenger RNA translational profiles // *Cancer research*. – 2006. – V. 66(18). – p. 8994-9001.
189. Rice S.A., Oliver J.D. Starvation response of the marine barophile Cnpt-3 // *Applied and environmental microbiology*. – 1992. – V. 58(8). – p. 2432-2437.
190. Robinson-Rechavi M., Alibes A., Godzik A. Contribution of electrostatic interactions, compactness and quaternary structure to protein thermostability: lessons from structural genomics of *Thermotoga maritime* // *J. Mol. Biol.* – 2006. – V. 356. – p. 547–557.
191. Rothschild L.J., Mancinelli R.L. Life in extreme environments // *Nature*. – 2001. – V. 409(6823). – p. 1092-1101.
192. Royer C.A. Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. – 2002. – V. 1595(1). – p. 201-209.
193. Rueda M., Ferrer-Costa C., Meyer T., Pérez A., Camps J., Hospital A., Gelpí J.L., Orozco M. A consensus view of protein dynamics // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – V. 104(3). – p. 796-801.
194. Sadeghi M., Naderi-Manesh H., Zarrabi M., Ranjbar B. Effective factors in thermostability of thermophilic proteins // *Biophysical chemistry*. – 2006. – V. 119(3). – p. 256-270.
195. Sakai S., Conrad R., Liesack W., Imachi H. *Methanocella arvoryzae* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from rice field soil // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2010. – V. 60(12). – p. 2918-2923.
196. Sakai S., Imachi H., Hanada S., Ohashi A., Harada H., Kamagata Y. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage ‘Rice Cluster I’, and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2008. – V. 58(4). – p. 929-936.
197. Scandurra R., Consalvi V., Chiaraluce R., Politi L., Engel P.C. Protein thermostability in extremophiles // *Biochimie*. – 1998. – V. 80(11). – p. 933-941.
198. Schuler L.D., Daura X., van Gunsteren W.F. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase // *Journal of Computational Chemistry*. – 2001. – V. 22(11). – p. 1205-1218.
199. Sharma A., Scott J.H., Cody G.D., Fogel M.L., Hazen R.M., Hemley R.J., Huntress W.T. Microbial activity at gigapascal pressures // *Science*. – 2002. – V. 295(5559). – p. 1514-1516.

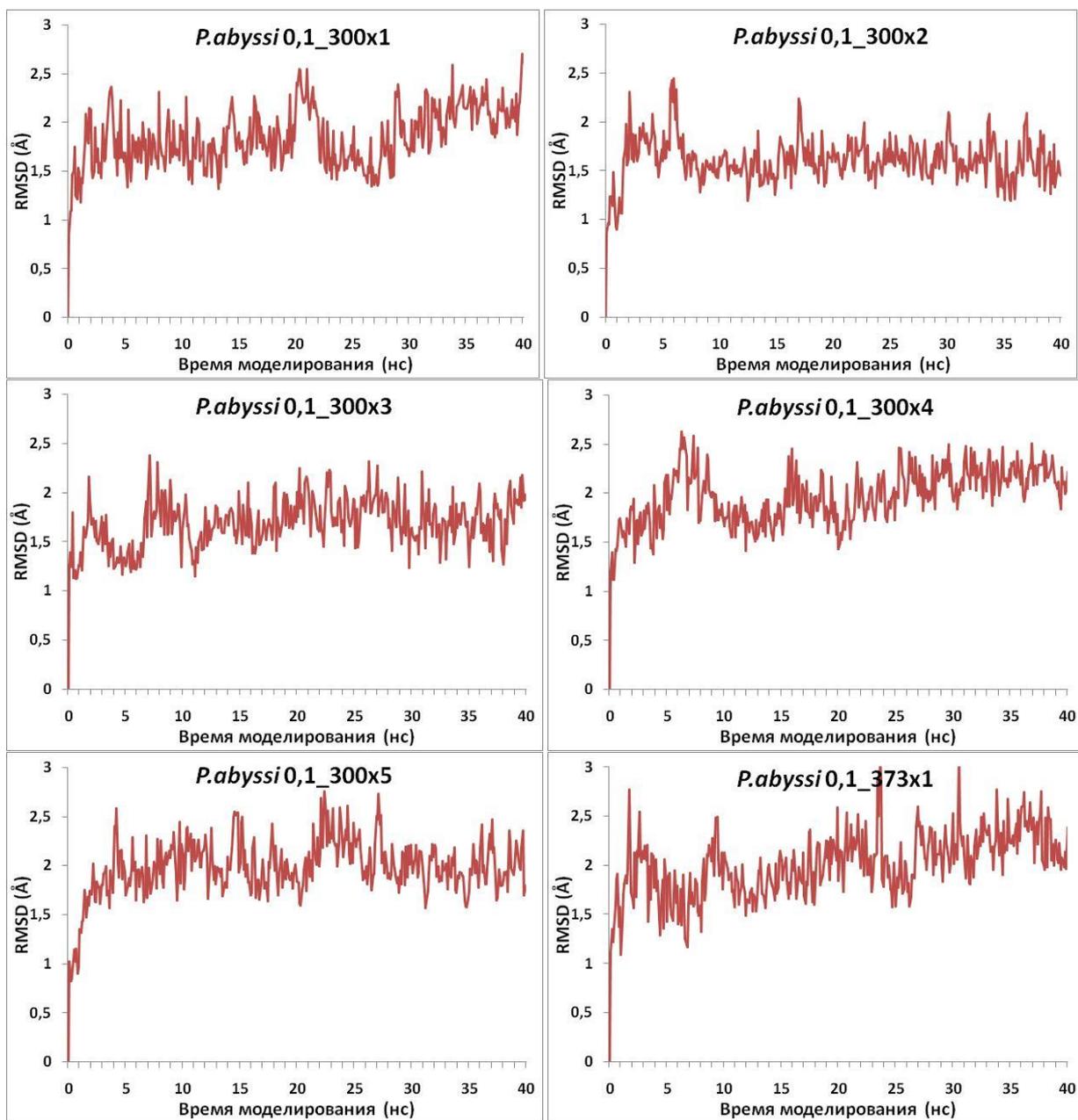
200. She Q., Singh R.K., Confalonieri F., Zivanovic Y., Allard G., Awayez M.J., Chan-Weiher C.C., Clausen I.G., Curtis B.A., De Moors A. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2 // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – V. 98(14). – p. 7835-7840.
201. Shindyalov I.N., Bourne P.E. Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path // Protein engineering. – 1998. – V. 11(9). – p. 739-747.
202. Seefeldt M.B., Rosendahl M.S., Cleland J.L., Hesterberg L.K. Application of high hydrostatic pressure to dissociate aggregates and refold proteins // Current pharmaceutical biotechnology. – 2009. – V. 10(4). – p. 447-455.
203. Sekiguchi T., Todaka Y., Wang Y., Hirose E., Nakashima N., Nishimoto T. A Novel Human Nucleolar Protein, Nop132, Binds to the G Proteins, RRAG A/C/D // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – V. 279(9). – p. 8343-8350.
204. Seob B. S., Kim Y. J., Yang S. H., Lim J. K., Jeon J. H., Lee H. S., Kang S. G., Kim S-J., Lee J-H. *Thermococcus onnurineus* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent area at the PACMANUS field // Journal of microbiology and biotechnology. – 2006. – V. 16(11). – p. 1826-1831.
205. Silva J.L., Weber G. Pressure stability of proteins // Annual Review of Physical Chemistry. – 1993. – V. 44(1). – p. 89-113.
206. Simonato F., Campanaro S., Lauro F.M., Vezzi A., D'Angelo M., Vitulo N., Valle G., Bartlett D. Piezophilic adaptation: a genomic point of view // Journal of biotechnology. – 2006. – V. 126(1). – p. 11-25.
207. Smith L.J. Computational methods for generating models of denatured and partially folded proteins // Methods. – 2004. – V. 34(1). – p. 144-150.
208. Smeller L., Roemich H., Lange R. Proteins under high pressure // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. – 2006. – V. 1764(3). – p. 329-330.
209. Somero G.N. Proteins and temperature // Annual review of physiology. – 1995. – V. 57(1). – p. 43-68.
210. Sterner R., Leibl W. Thermophilic adaptation of proteins // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. – 2001. – V. 36(1). – p. 39-106.
211. Stetter K. O. *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov.: a New Taxon of Extremely Thermophilic Archaeobacteria // Systematic and Applied Microbiology. – 1988. – V. 10(2). – p. 172-173.
212. Stetter K. O. Hyperthermophiles in the history of life // Ciba Foundation Symposium 202-Evolution of Hydrothermal Ecosystems on Earth (And Mars?). – John Wiley & Sons, Ltd., 1996. – p. 1-23.

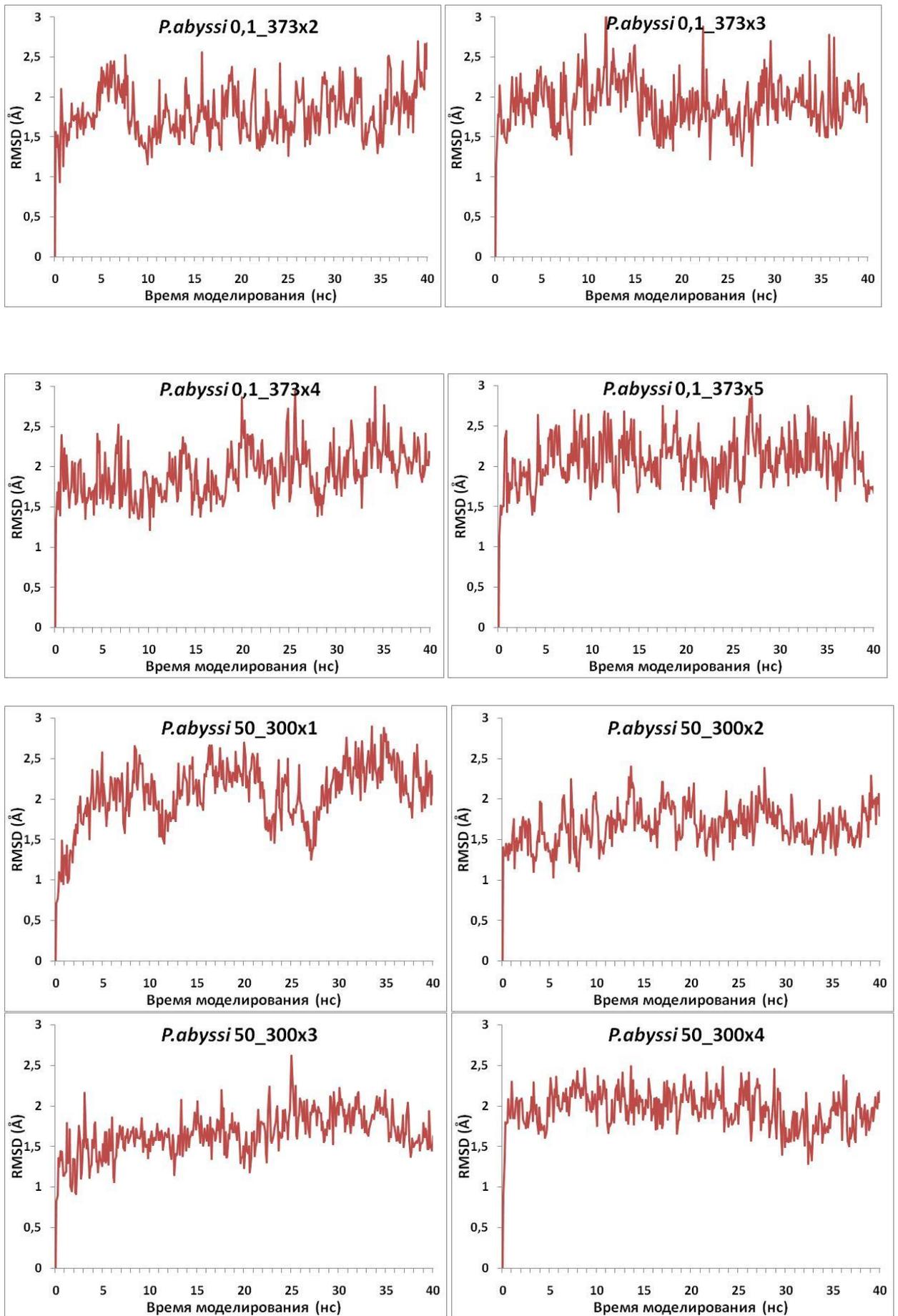
213. Stetter K. O. Extremophiles and their adaptation to hot environments // FEBS letters. – 1999. – V. 452(1). – p. 22-25.
214. Sun M.M., Tolliday N., Vertiani C., Robb F.T., Clark D.S. Pressure-induced thermostabilization of glutamate dehydrogenase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* // Protein science. – 1999. – V. 8(5). – p. 1056-1063.
215. Sun M.M., Caillot R., Mark G., Robb F.T., Clark D.S. Mechanism of pressure-induced thermostabilization of proteins: studies of glutamate dehydrogenases from the hyperthermophile *Thermococcus litoralis* // Protein Science. – 2001. – V. 10(9). – p. 1750-1757.
216. Swezey R.R., Somero O.N. Polymerization thermodynamics and structural stabilities of skeletal muscle actins from vertebrates adapted to different temperatures and pressures // Biochemistry. – 1982. – V. 21(18). – p. 4496-4503.
217. Talluri S. Advances in engineering of proteins for protein stability // International Journal of Advanced Biotechnology and Research. – 2011. V. (2)1. – p. 190-220.
218. Takai K., Neilson K. H., Horikoshi K. *Methanotorris formicicus* sp. nov., a novel extremely thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a black smoker chimney in the Central Indian Ridge // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2004. – V. 54(4). – p. 1095-1100.
219. Teppa E., Wilkins A.D., Nielsen M., Buslje C.M. Disentangling evolutionary signals: conservation, specificity determining positions and coevolution. Implication for catalytic residue prediction // BMC bioinformatics. – 2012. – V. 13(1). – p. 235.
220. Theobald D.L., Mitton-Fry R.M., Wuttke D.S. Nucleic acid recognition by OB-fold proteins // Annual review of biophysics and biomolecular structure. – 2003. – V. 32. – p. 115.
221. Tiberti M., Papaleo E. Dynamic properties of extremophilic subtilisin-like serine-proteases // Journal of structural biology. – 2011. – V. 174(1). – p. 69-83.
222. Tor J.M., Kashefi K., Lovley D.R. Acetate oxidation coupled to Fe(III) reduction in hyperthermophilic microorganisms // Applied and environmental microbiology. – 2001. – V. 67(3). – p. 1363-1365.
223. Trzesniak D., Lins R.D., van Gunsteren W.F. Protein under pressure: molecular dynamics simulation of the arc repressor // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 2006. – V. 65(1). – p. 136-144.
224. Turner C., Sriskandan S. Streptococcus pyogenes under pressure // Nature medicine. – 2007. – V. 13(8). – p. 909-910.

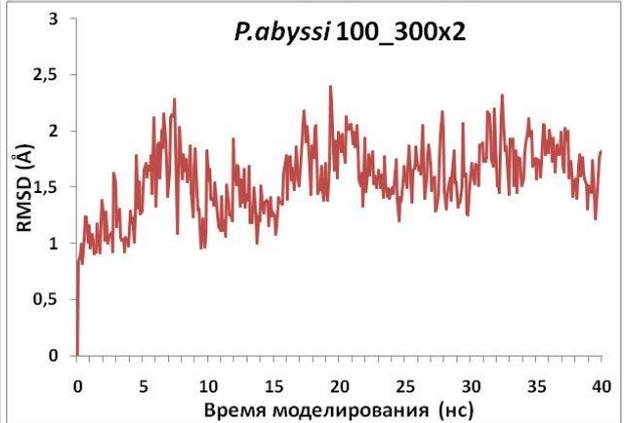
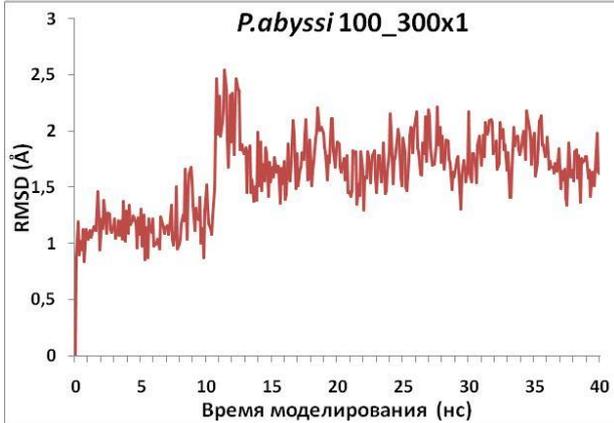
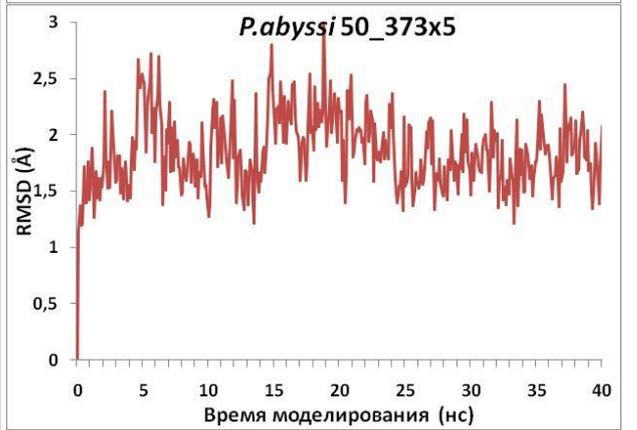
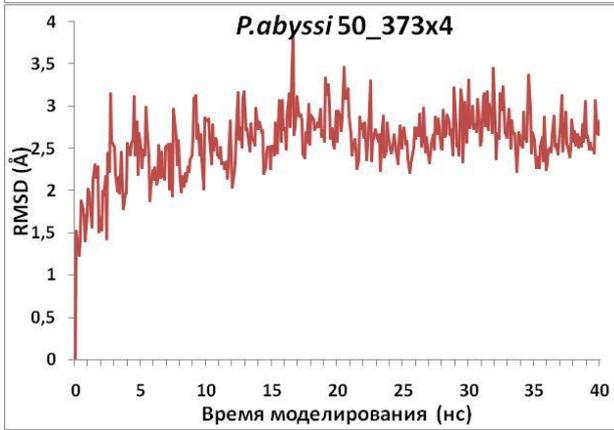
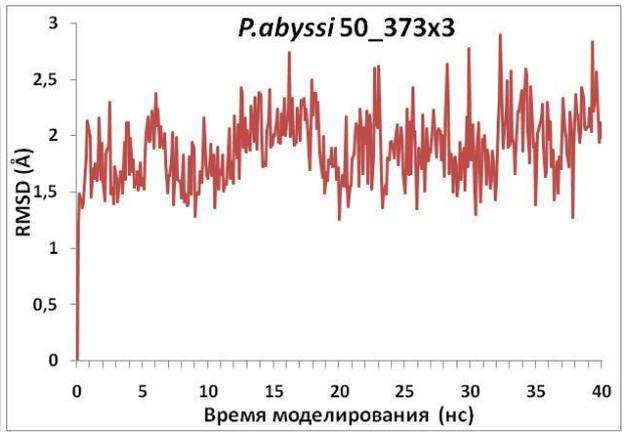
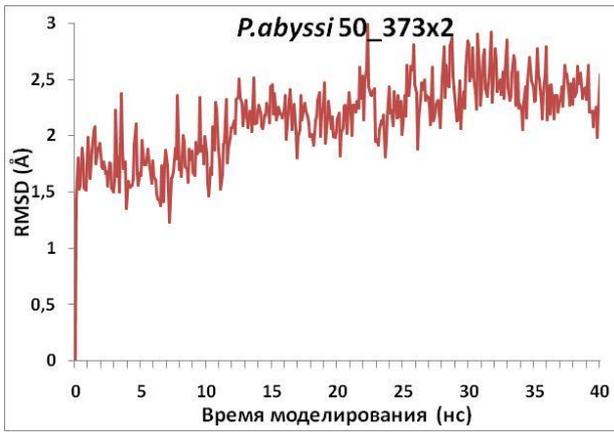
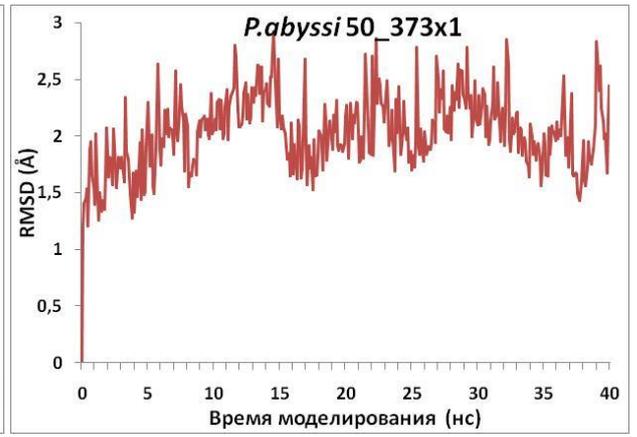
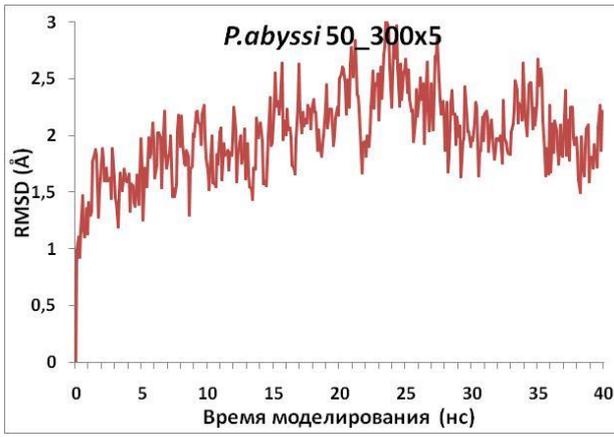
225. Uversky V.N., Dunker A.K. The case for intrinsically disordered proteins playing contributory roles in molecular recognition without a stable 3D structure // *F1000 biology reports*. – 2013. – T. 5.
226. Van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A. E., Berendsen H. J. C. GROMACS: Fast, Flexible and Free // *Journal of computational chemistry*. – 2005. – V. 26(16). – p. 1701-1718.
227. Van de Vossenberg J.L.C.M., Driessen A.J.M., Konings W.N. The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids // *Extremophiles*. – 1998. – V. 2(3). – p. 163-170.
228. van Gunsteren W.F., Berendsen H.J.C. Algorithms for macromolecular dynamics and constraint dynamics // *Molecular Physics*. – 1977. – V. 34(5). – p. 1311-1327.
229. van Noort V., Bradatsch B., Arumugam M., Amlacher S., Bange G., Creevey C., Falk S., Mende D.R., Sinning I., Hurt E., Bork P. Consistent mutational paths predict eukaryotic thermostability // *BMC evolutionary biology*. – 2013. – V. 13(1). – p. 7.
230. Vogt G., Woell S., Argos P. Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs // *Journal of molecular biology*. – 1997. – V. 269(4). – p. 631-643.
231. Wang X., Gao Z., Xu X., Ruan L. Complete genome sequence of *Thermococcus sp.* strain 4557, a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent area // *Journal of bacteriology*. – 2011. – V. 193(19). – p. 5544-5545.
232. Weber G., Drickamer H.G. The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules // *Quarterly reviews of biophysics*. – 1983. – V. 16(1). – p. 89-112.
233. Weber G., Van Eldik R., Jonas J. High pressure chemistry and biochemistry // Reidel, Dordrecht. – 1987. – p. 401-420.
234. Weber G. Protein interactions. – New York: Chapman and Hall, 1992. – p. 1-287.
235. Winter R. High pressure effects in molecular bioscience // *Chemistry at Extreme Conditions*. – 2005. – p. 29-82.
236. Wirsen C.O., Molyneaux S.J. A study of deep-sea natural microbial populations and barophilic pure cultures using a high-pressure chemostat // *Applied and environmental microbiology*. – 1999. – V. 65(12). – p. 5314-5321.
237. Witte U., Wenzhofer F., Sommer S., Boetius A., Heinz P., Aberle N., Sand M., Cremer A., Abraham W.R., Jorgensen B.B. In situ experimental evidence of the fate of a phytodetritus pulse at the abyssal sea floor // *Nature*. – 2003. – V. 424(6950). – p. 763-766.
238. Zanchin N.I.T., Goldfarb D.S. Nip7p Interacts with Nop8p, an Essential Nucleolar Protein Required for 60S Ribosome Biogenesis, and the Exosome Subunit Rrp43p // *Molecular and cellular biology*. – 1999. – V. 19(2). – p. 1518-1525.

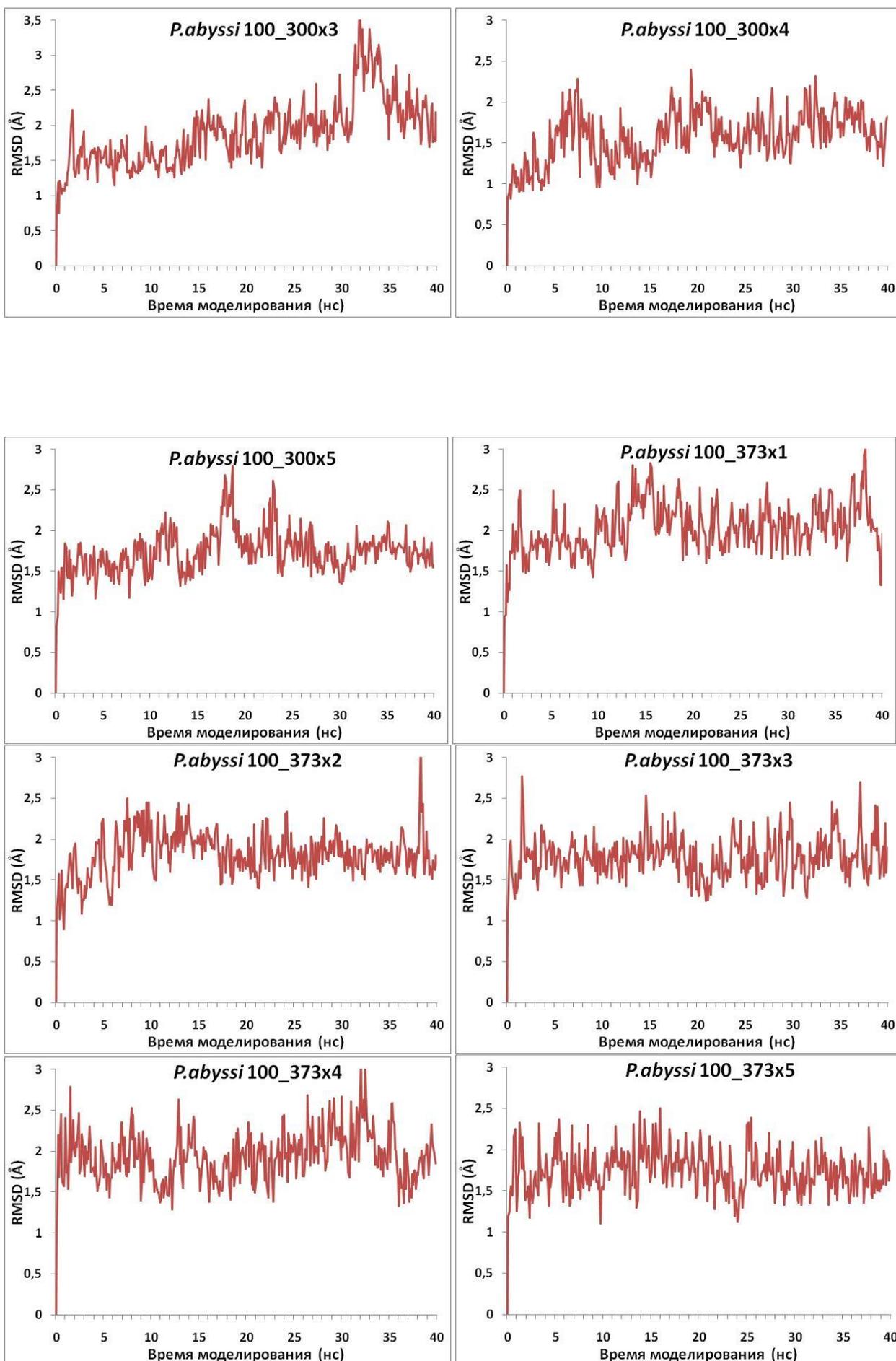
239. Zeldovich K. B., Berezovsky I. N., Shakhnovich E. I. Protein and DNA sequence determinants of thermophilic adaptation // *PLoS computational biology*. – 2007. – V. 3(1). – p. e5.
240. Zeng X., Birrien J.L., Fouquet Y., Cherkashov G., Jebbar M., Querellou J., Oger P., Cambon-Bonavita M.A., Xiao X., Prieur D. *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile: extending the upper pressure-temperature limits for life // *The ISME journal*. – 2009. – V. 3(7). – p. 873-876.
241. Zhang C.L., Ye Q., Reysenbach A.L., Götz D., Peacock A., White D.C., Horita J., Cole D.R., Fong J., Pratt L., Fang J., Huang Y. Carbon isotopic fractionations associated with thermophilic bacteria *Thermotoga maritima* and *Persephonella marina* // *Environmental microbiology*. – 2002. – V. 4(1). – p. 58-64.
242. Zhang J., Rosenberg H. F., Nei M. Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – V. 95(7). – p. 3708-3713.
243. Zhang J. Rates of conservative and radical nonsynonymous nucleotide substitutions in mammalian nuclear genes // *Journal of molecular evolution*. – 2000. – V. 50(1). – p. 56-68.
244. Zhang Z.Y., Zhu Y.J., Shi Y.Y. Molecular dynamics simulations of urea and thermal-induced denaturation of s-peptide analogue // *Biophysical chemistry*. – 2001. – V. 89(2). – p. 145-162.
245. Zhu F., Tajkhorshid E., Schulten K. Pressure-induced water transport in membrane channels studied by molecular dynamics // *Biophysical journal*. – 2002. – V. 83(1). – p. 154-160.

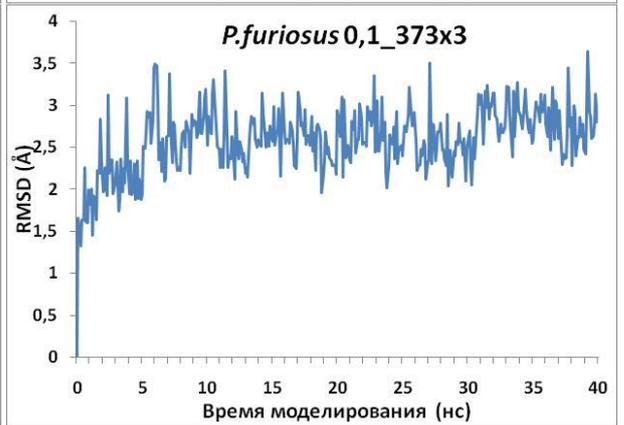
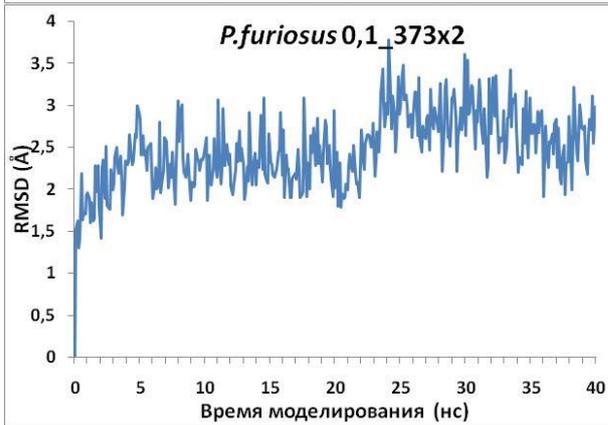
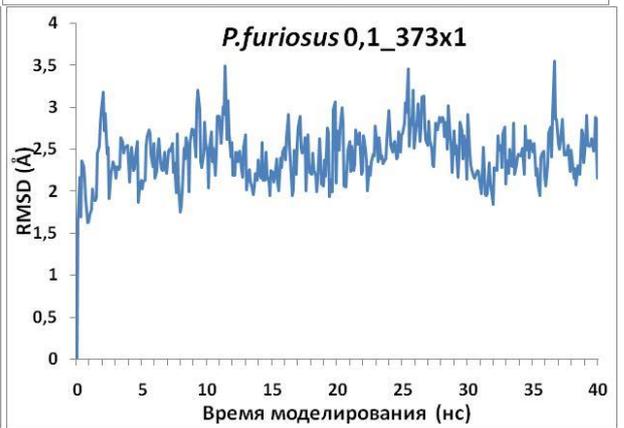
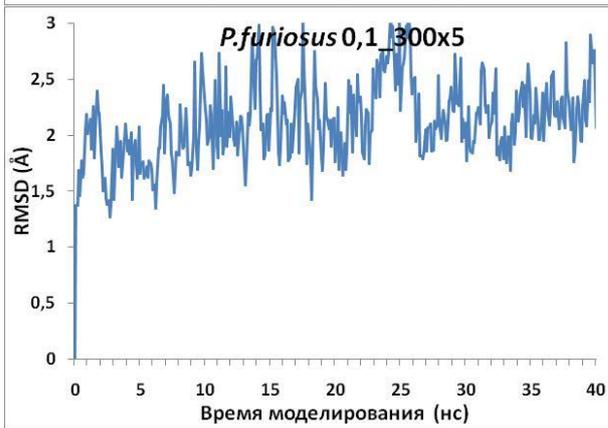
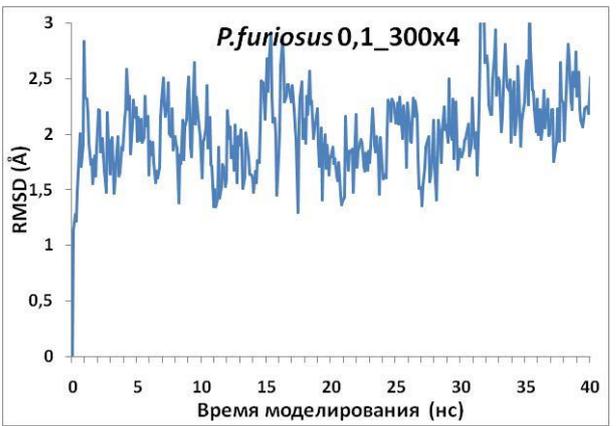
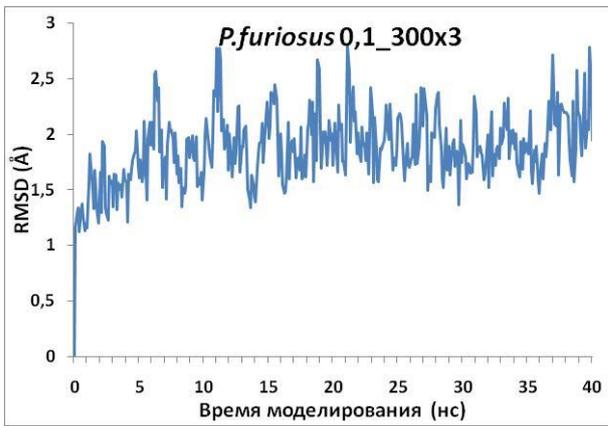
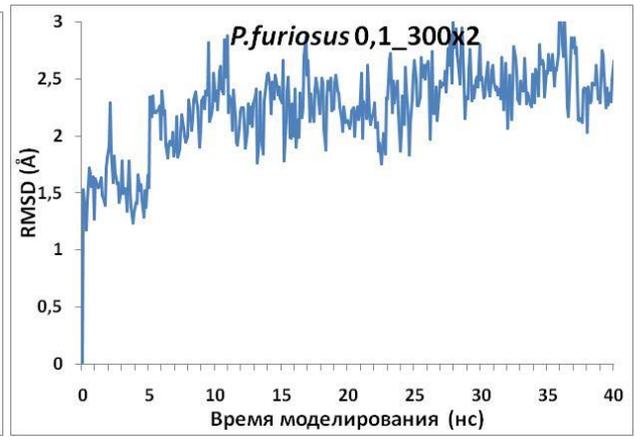
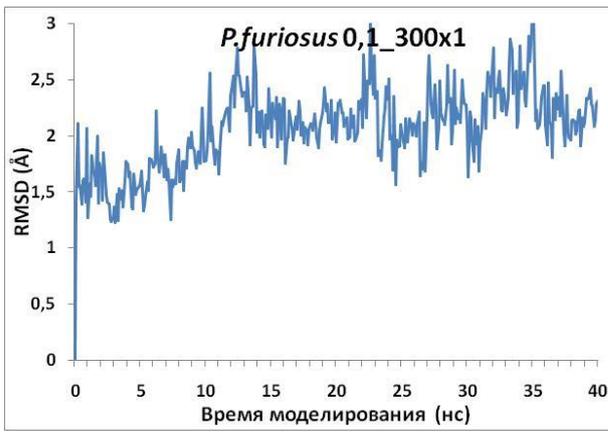
## Приложение №1

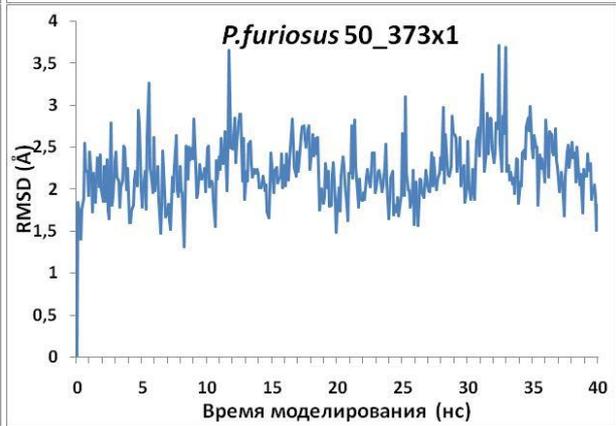
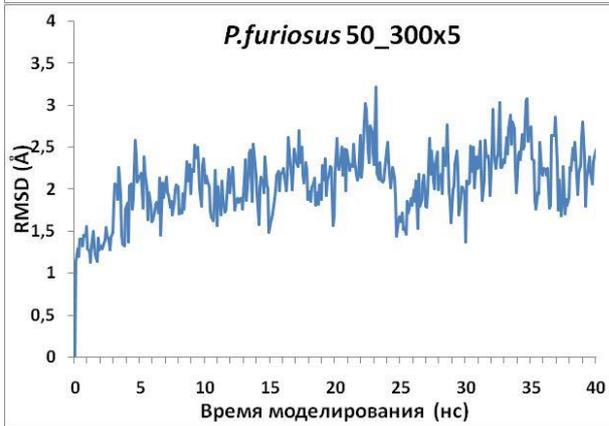
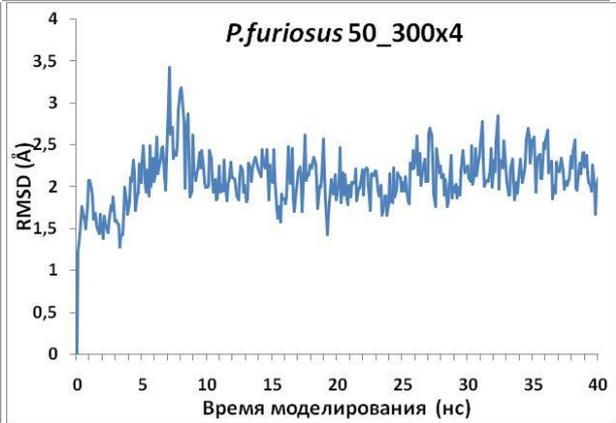
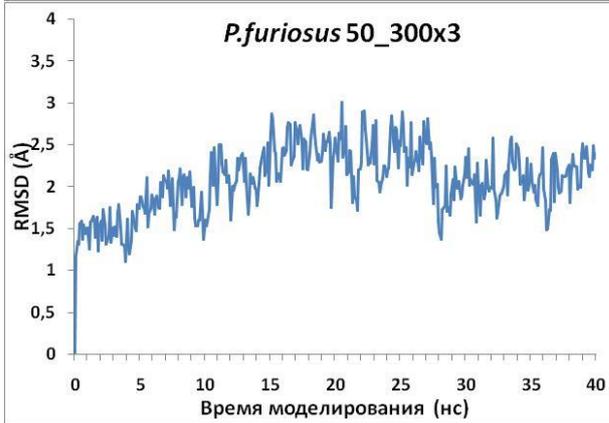
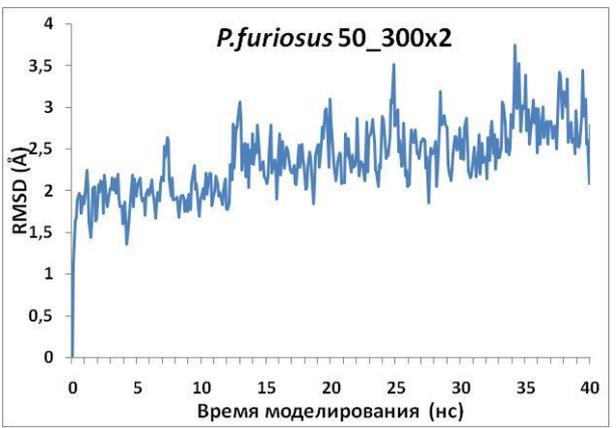
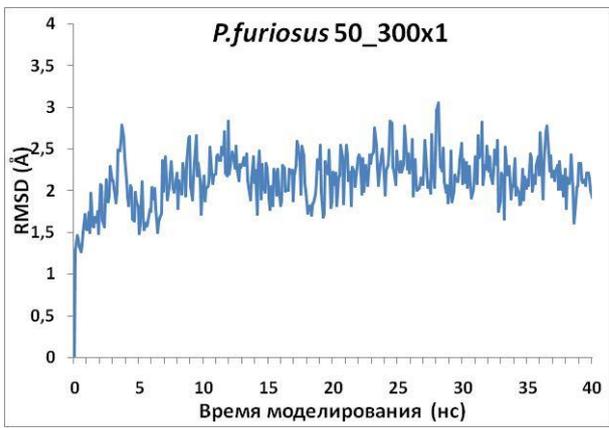
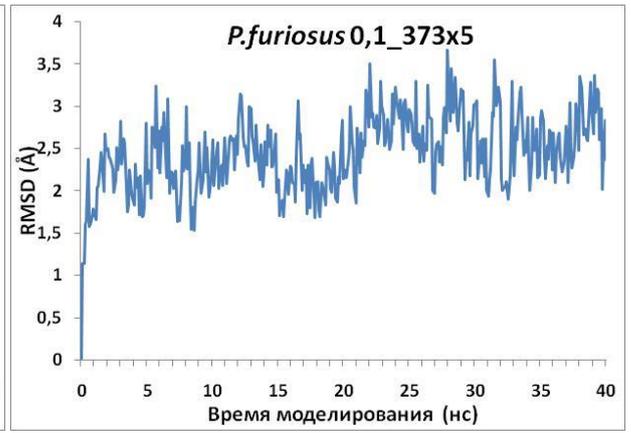
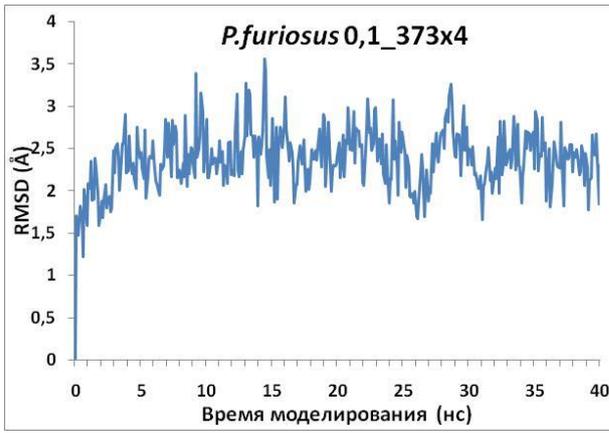


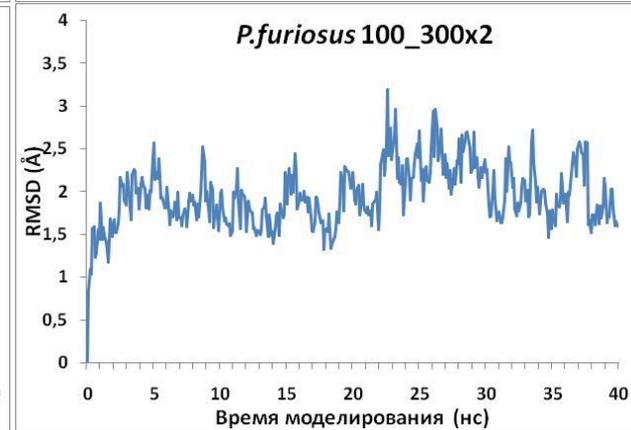
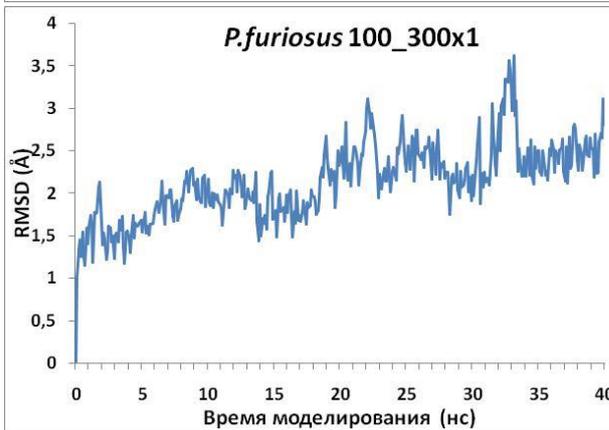
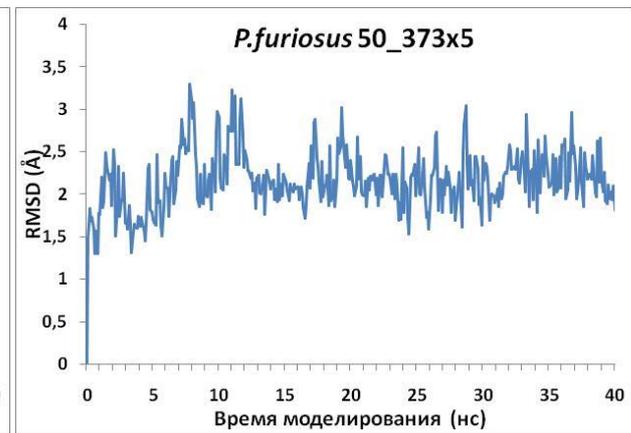
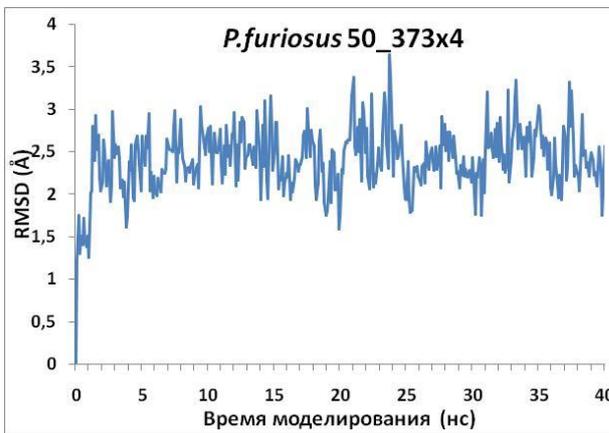
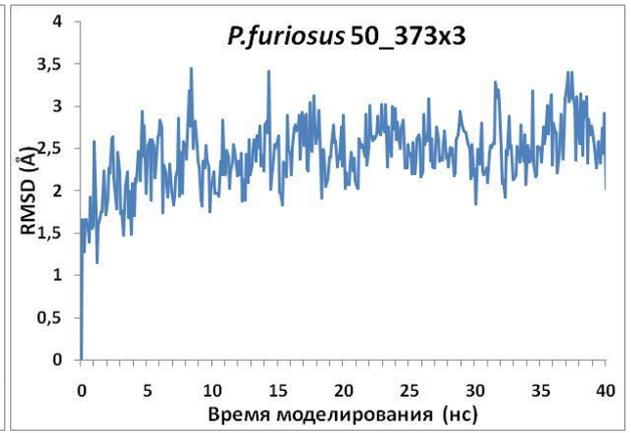
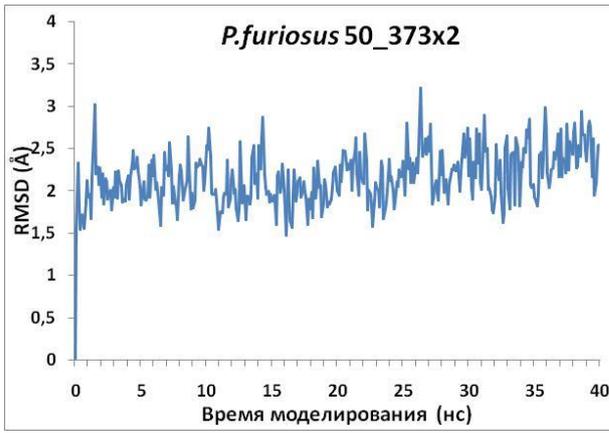


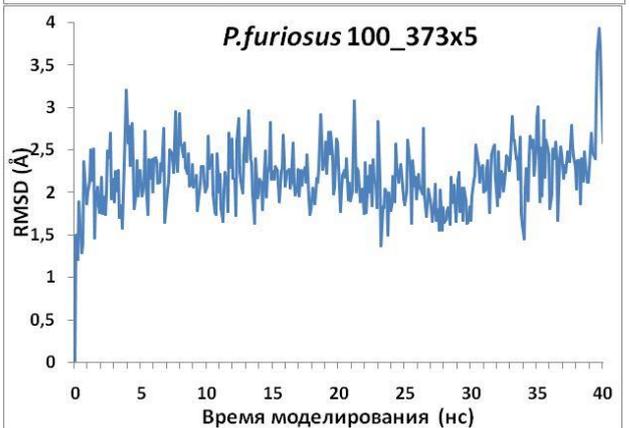
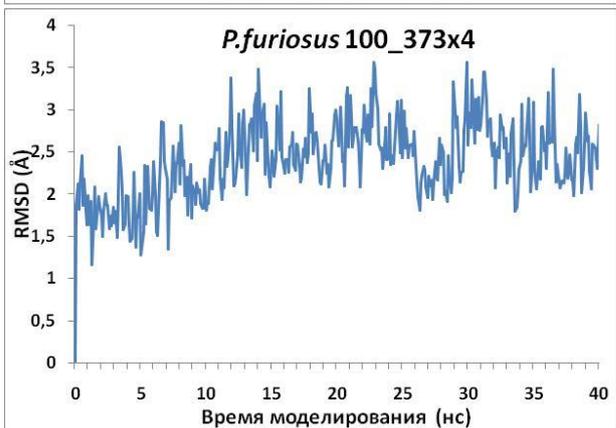
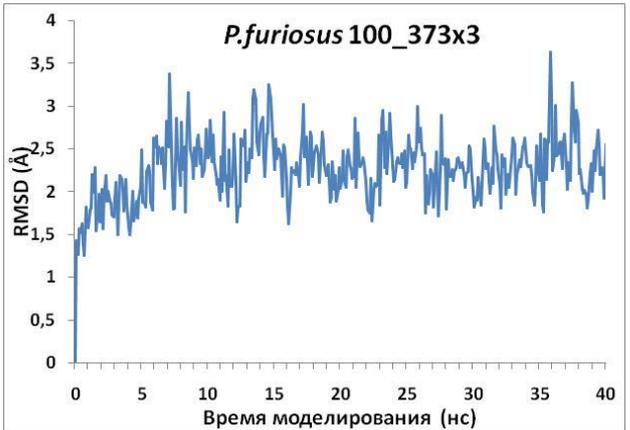
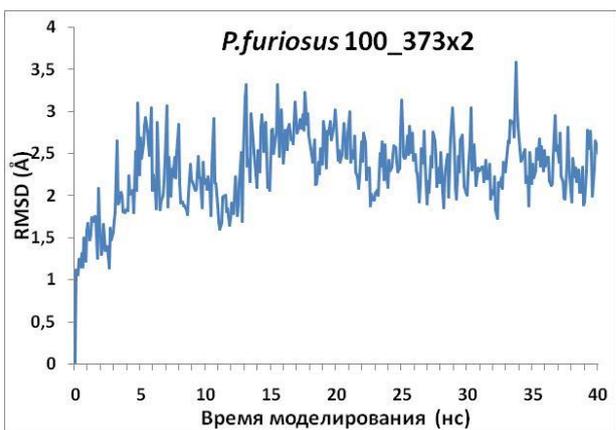
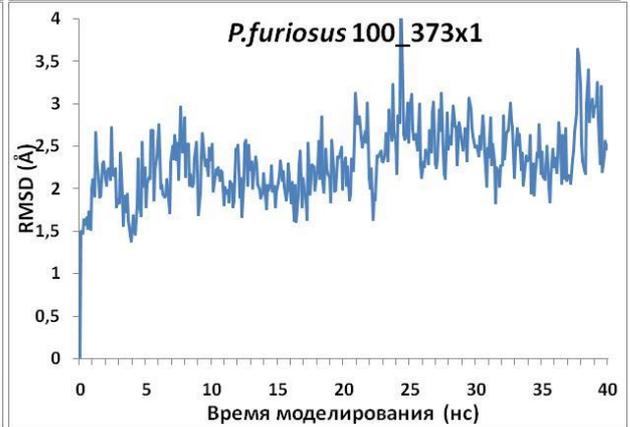
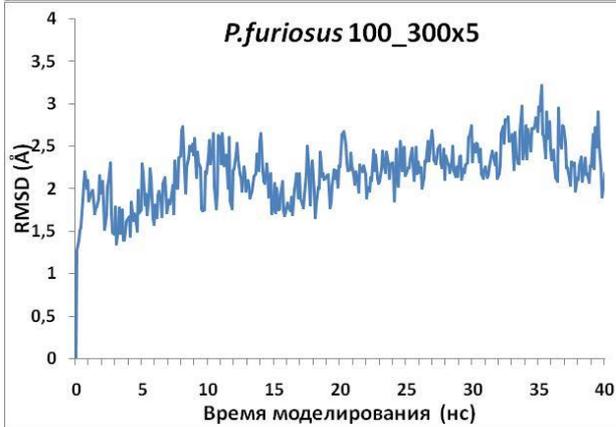
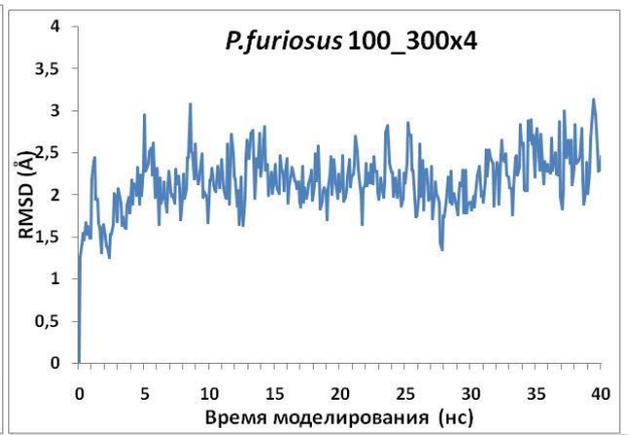
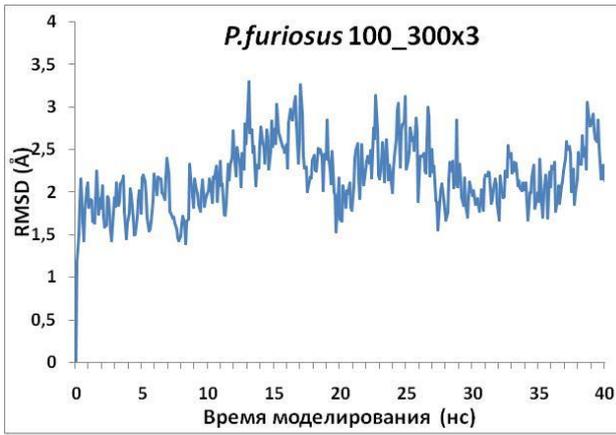












**Рисунок 1.1:** Графики зависимости отклонения значения RMSD C $\alpha$  атомов от начальной структуры в процессе моделирования молекулярной динамики. График значений RMSD для белка Nip7 *P.abysssi* красный, для *P.furiosus* синий. В названиях графиках первая цифра соответствует значению давления в МПа, вторая – температуре в К, третья – номер эксперимента.

## Приложение №2

**Таблица 2.1.** Результаты двухфакторного дисперсионного анализа влияния давления и температуры на изменения радиуса гирации модели белка NIP7-ABY при всех параметрах моделирования.

Радиус гирации (Rg)	NIP7-ABY	
	300K	373K
0,1 МПа	17,27	17,25
	17,74	17,75
	17,75	17,87
	17,65	17,86
	17,98	17,81
50 МПа	17,31	17,81
	17,69	17,67
	17,62	17,73
	17,59	18,11
	17,86	17,66
100 МПа	17,16	17,72
	17,72	17,58
	17,89	17,63
	17,96	17,53
	17,67	17,69

<b>NIP7-ABY</b>	SS	df	MS	F
Давление, (P)	0,013	2	0,006	0,121
Температура, (T)	0,019	1	0,019	0,359
(PхT)	0,069	2	0,034	0,657
Ошибка внутри группы	1,262	24	0,052	
Общее	1,362	29	0,112	1,138

**Таблица 2.2.** Результаты двухфакторного дисперсионного анализа влияния давления и температуры на изменения радиуса гирации модели белка NIP7-FUR при всех параметрах моделирования.

Радиус гирации (Rg)	<b>NIP7-FUR</b>	
	300K	373K
0,1 МПа	17,81	17,78
	17,79	17,95
	17,71	17,75
	17,76	17,77
	17,84	17,81
50 МПа	17,82	17,67
	17,84	17,71
	17,86	17,86
	17,86	17,71
100 МПа	17,73	17,77
	17,78	17,72
	17,89	17,80
	17,61	17,65
	17,81	17,72
	17,57	17,66

<b>NIP7-FUR</b>	SS	df	MS	F
Давление, (P)	0,03	2	0,015	2,422
Температура, (T)	0,003	1	0,003	0,521
(PхT)	0,014	2	0,007	1,063
Ошибка внутри группы	0,158	24	0,006	
Общее	0,207	29	0,033	4,0

## Приложение №3

**Таблица 3.1.** Результаты двухфакторного дисперсионного анализа влияния давления и температуры на изменения гидрофобной части поверхности остатков доступной растворителю модели белка NIP7-ABY при всех параметрах моделирования.

SAS	<b>NIP7-ABY Гидрофобная часть</b>	
	300K	373K
0,1 МПа	3754,03	3791,82
	3728,60	3776,85
	3509,08	3753,38
	3690,94	3812,28
	3749,10	3765,33
50 МПа	3546,99	3741,51
	3661,11	3664,87
	3655,81	3733,12

	3695,75	3651,24
	3721,40	3744,66
100 МПа	3716,32	3704,77
	3651,43	3741,41
	3723,70	3686,18
	3700,32	3669,01
	3664,97	3688,98

167

<b>NIP7-ABY</b> <b>Гидрофобная часть</b>	SS	df	MS	F
Давление, (P)	14330,96	2	7165,48	2,24
Температура, (T)	19043,91	1	19043,91	<b>5,95</b>
(PхT)	9432,12	2	4716,06	1,47
Ошибка внутри группы	76841,40	24	3201,72	
Общее	119648,38	29	34127,17	9,66

**Таблица 3.2.** Результаты двухфакторного дисперсионного анализа влияния давления и температуры на изменения гидрофобной части поверхности остатков доступной растворителю модели белка NIP7-FUR при всех параметрах моделирования.

SAS	<b>NIP7-FUR Гидрофобная часть</b>	
	300K	373K
0,1 МПа	3894,52	3839,32
	3863,65	3897,76
	3873,53	3885,31
	3834,14	3831,12
	3891,05	3819,93
50 МПа	3991,08	3827,33
	3909,34	3851,08
	3867,69	3825,18
	3901,84	3848,39
	3760,01	3892,81
100 МПа	3813,42	3850,56
	3897,58	3806,84
	3826,98	3841,90

<b>NIP7-FUR</b> <b>Гидрофобная часть</b>	SS	df	MS	F
Давление, (P)	6657,77	2	3328,89	1,67
Температура, (T)	7997,37	1	7997,37	4,00
(PхT)	1020,74	2	510,37	0,26
Ошибка внутри группы	47947,45	24	1997,81	
Общее	63623,33	29	13834,44	5,92

	3858,57	3771,30
	3883,49	3788,24

**Таблица 3.3.** Результаты двухфакторного дисперсионного анализа влияния давления и температуры на изменения гидрофильной части поверхности остатков доступной растворителю модели белка NIP7-ABY при всех параметрах моделирования.

SAS	<b>NIP7-ABY</b> <b>Гидрофильная часть</b>	
	300K	373K
0,1 МПа	6370,82	6505,58
	6282,19	6468,06

	6312,84	6452,91
	6491,25	6439,69
	6421,99	6493,13
50 МПа	6575,35	6421,13
	6471,73	6402,16
	6267,27	6449,69
	6299,29	6468,24
	6613,41	6418,28
100 МПа	6423,52	6423,91
	6350,40	6237,73
	6469,28	6296,94
	6496,89	6398,96
	6480,94	6425,08

<b>NIP7-ABY</b> <b>Гидрофильная часть</b>	SS	df	MS	F
Давление, (P)	7455,57	2	3727,79	0,51
Температура, (T)	21,96	1	21,96	0,00
(PхT)	42720,99	2	21360,49	2,92
Ошибка внутри группы	175602,26	24	7316,76	
Общее	225800,78	29	32427,00	3,43

**Таблица 3.4.** Результаты двухфакторного дисперсионного анализа влияния давления и температуры на изменения гидрофильной части поверхности остатков доступной растворителю модели белка NIP7-FUR при всех параметрах моделирования.

SAS	NIP7-FUR Гидрофильная часть	
	300K	373K
0,1 МПа	6164,62	6246,51
	6195,46	6199,92
	6127,65	6108,01
	6169,68	6215,24
	6194,49	6244,08
50 МПа	6113,44	6198,37
	6126,22	6220,36
	6172,92	6181,07
	6180,39	6175,99
	6084,81	6208,50
100 МПа	6077,94	6152,98
	6188,40	6144,58
	6214,89	6076,46
	6089,54	6098,46
	6109,40	6168,33

<b>NIP7-FUR</b> <b>Гидрофильная часть</b>	SS	df	MS	F
Давление, (P)	15148,63	2	7574,31	<b>4,04</b>
Температура, (T)	6135,46	1	6135,46	3,27
(PхT)	6034,35	2	3017,17	1,61
Ошибка внутри группы	45025,13	24	1876,05	
Общее	72343,57	29	18603,00	8,92

**Таблица 3.5.** Результаты двухфакторного дисперсионного анализа влияния давления и температуры на изменения всей поверхности остатков доступной растворителю модели белка NIP7-ABY при всех параметрах моделирования.

SAS	NIP7-ABY весь белок	
	300K	373K
0,1 МПа	10124,85	10297,40

	10010,79	10244,91
	9821,92	10206,30
	10182,19	10251,98
	10171,09	10258,46
50 МПа	10122,33	10162,64
	10132,84	10067,03
	9923,08	10182,81
	9995,04	10119,47
	10334,81	10162,94
100 МПа	10139,85	10128,69
	10001,83	9979,14
	10192,98	9983,12
	10197,22	10067,96
	10145,91	10114,06

<b>NIP7-ABY весь белок</b>	SS	df	MS	F
Давление, (P)	19383,94	2	9691,97	0,94
Температура, (T)	17772,15	1	17772,15	1,72
(PхT)	92013,08	2	46006,54	<b>4,46</b>
Ошибка внутри группы	247539,56	24	10314,15	
Общее	376708,73	29	83784,81	7,12

**Таблица 3.6.** Результаты двухфакторного дисперсионного анализа влияния давления и температуры на изменения всей поверхности остатков доступной растворителю модели белка NIP7-FUR при всех параметрах моделирования.

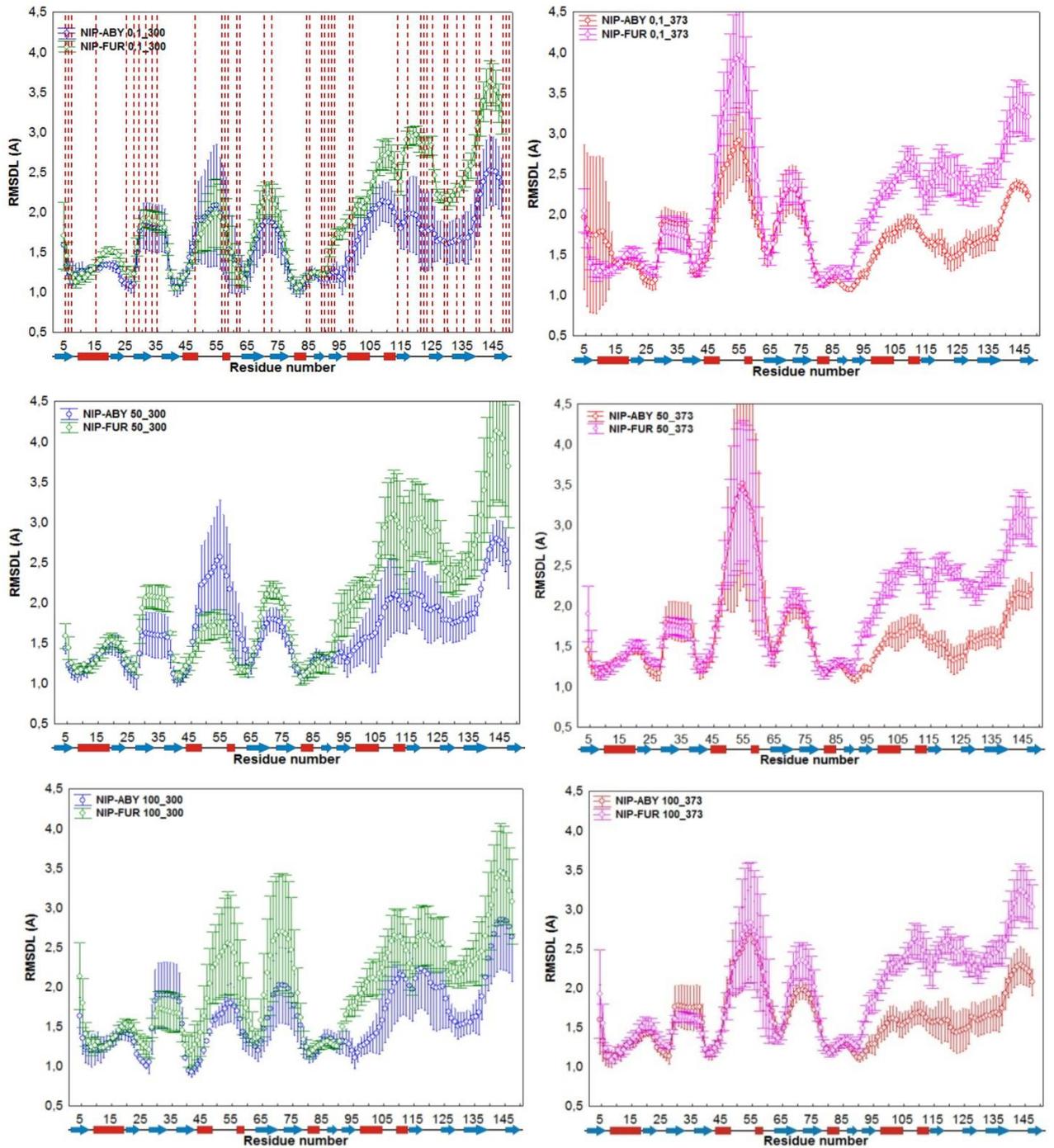
SAS	NIP7-FUR весь белок	
	300K	373K
0,1 МПа	10059,14	10085,83
	10059,11	10097,69
	10001,18	9993,31
	10003,82	10046,36
	10085,54	10064,01
50 МПа	10104,52	10025,70
	10035,56	10071,44
	10040,62	10006,25
	10082,23	10024,38
	9844,82	10101,30
100 МПа	9891,35	10003,54
	10085,99	9951,42
	10041,86	9918,37
	9948,11	9869,76
	9992,89	9956,57

<b>NIP7-FUR весь белок</b>	SS	df	MS	F
Давление, (P)	39424,33	2	19712,16	<b>5,03</b>
Температура, (T)	123,16	1	123,16	0,03
(PхT)	8751,76	2	4375,88	1,12
Ошибка внутри группы	94054,14	24	3918,92	
Общее	142353,40	29	28130,13	6,18

## Приложение №4

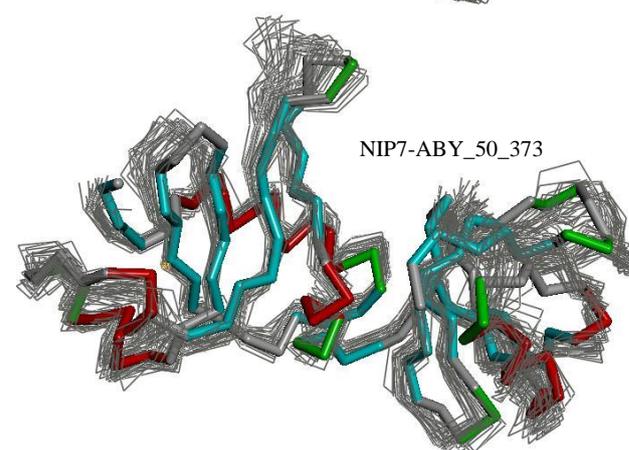
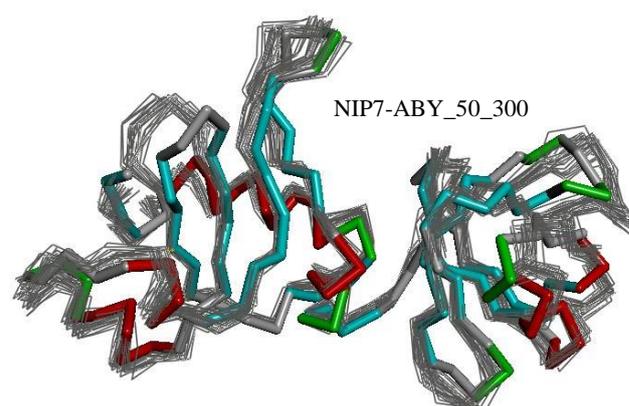
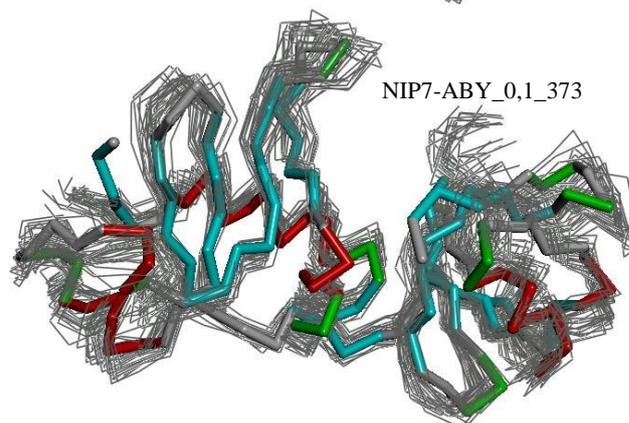
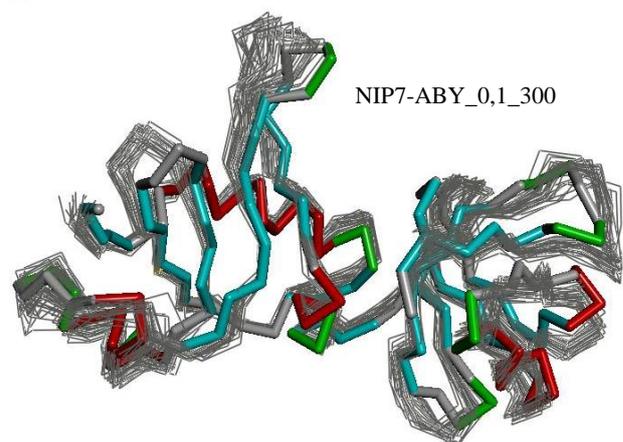
А

Б

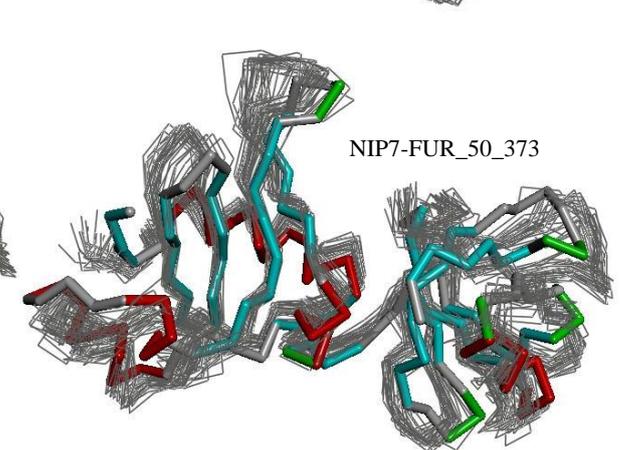
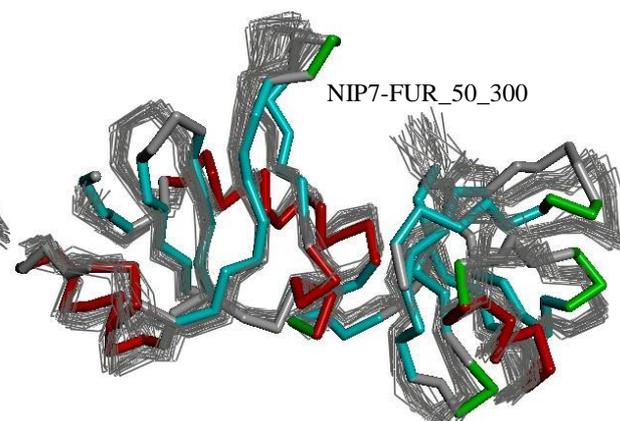
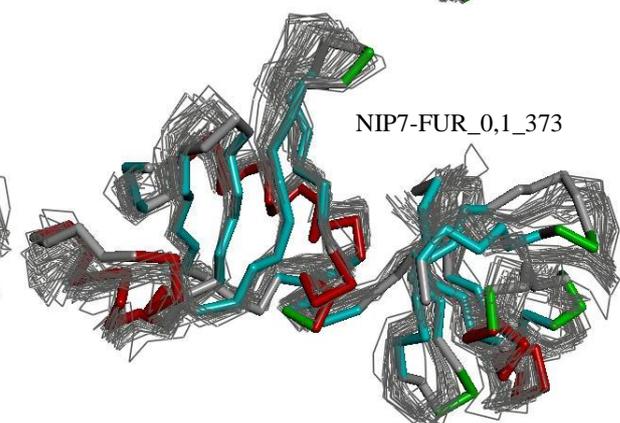
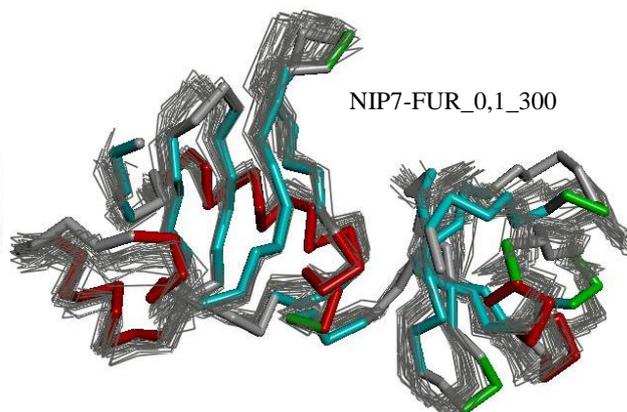


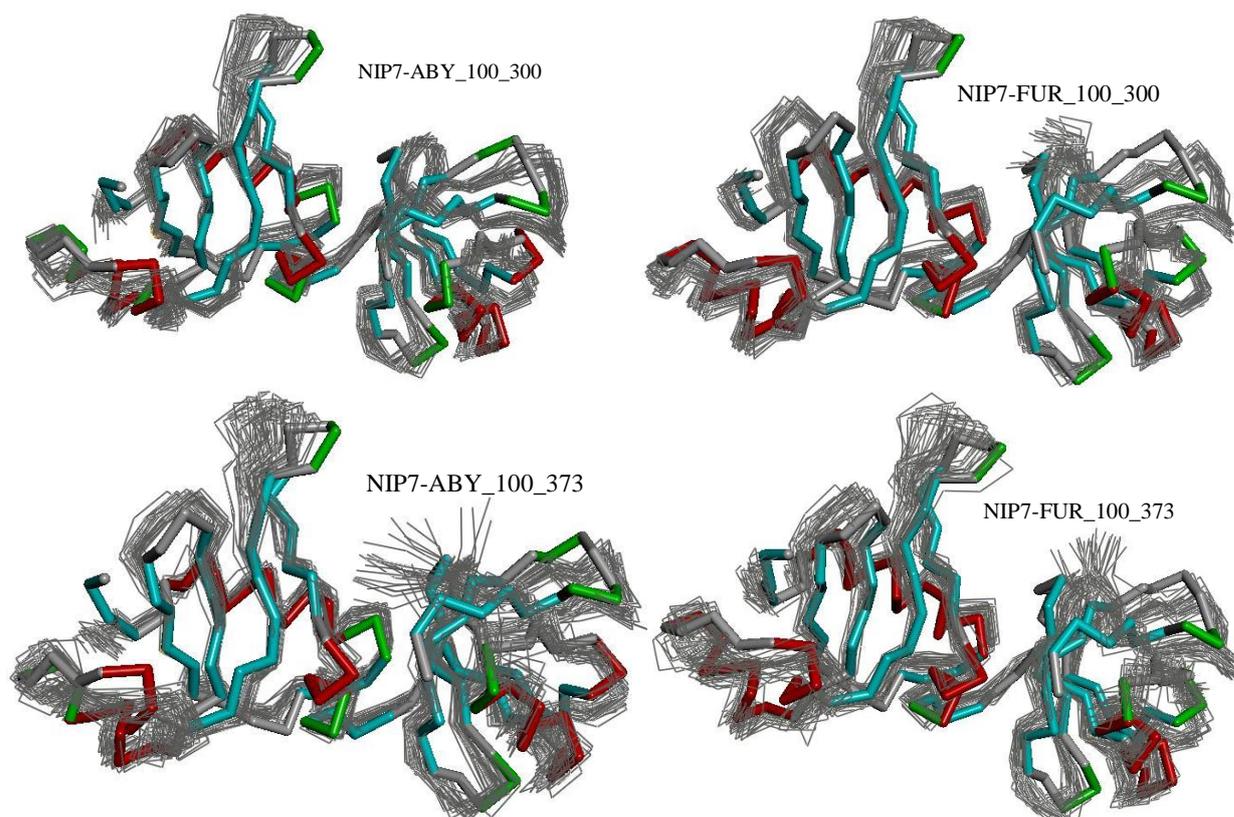
**Рисунок 4.1:** (А) Графики зависимости значения локального RMSDL от номера аминокислотного остатка при температуре 300 К. График значений RMSDL для белка Nip7 *P.abysssi* синий, для *P.furiosus* зеленый. Красными пунктирными линиями показаны замены в белке *P.furiosus* относительно белка *P.abysssi*. (Б) Графики зависимости значения локального RMSDL от номера аминокислотного остатка при температуре 373 К. График значений RMSDL для белка Nip7 *P.abysssi* красный, для *P.furiosus* розовый. Вторичная структура белка схематично показана под графиками:  $\beta$ -листы – синие стрелки;  $\alpha$ -спирали – красные прямоугольники.

A



Б

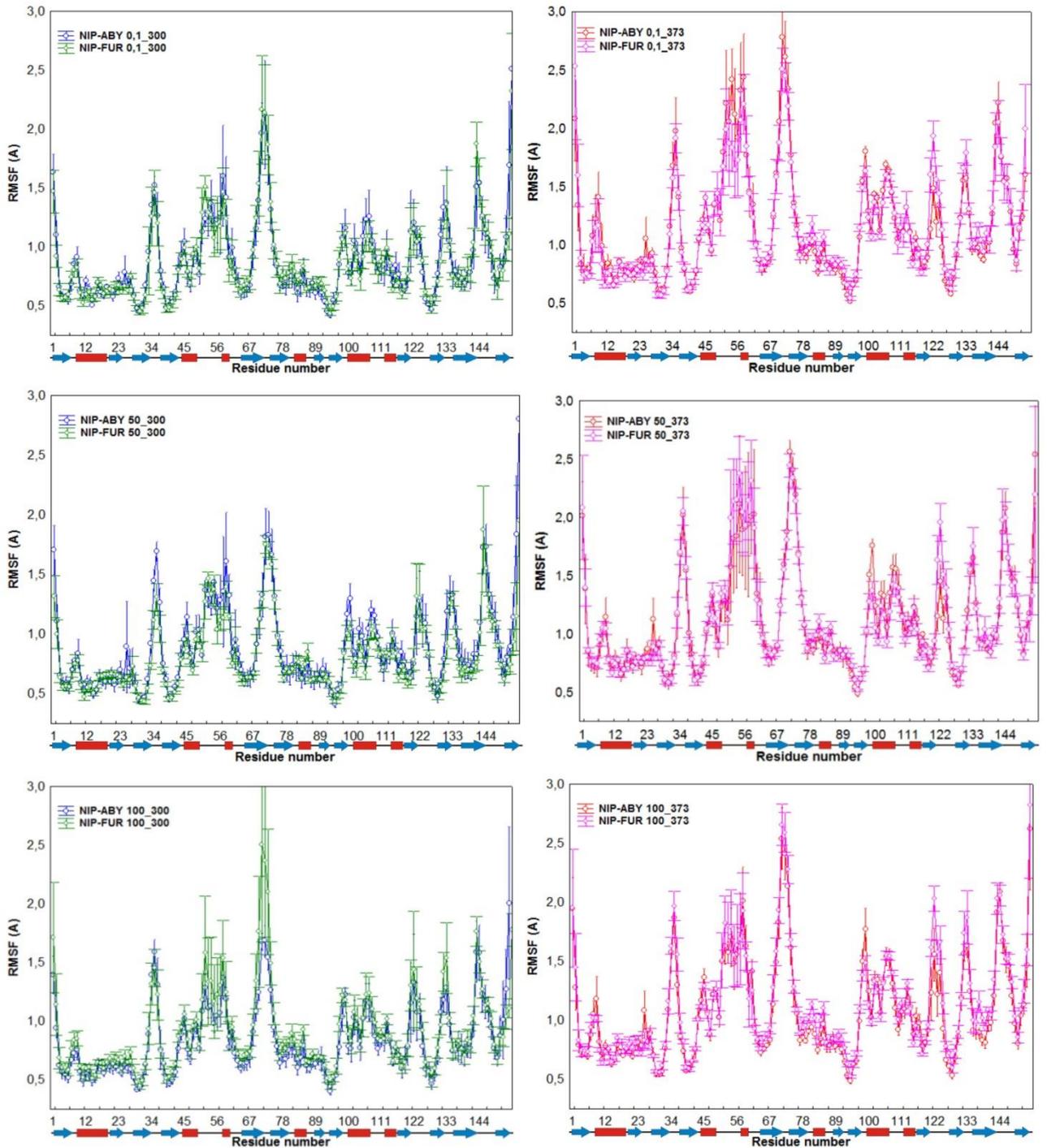




**Рисунок 4.2:** (А) Снэпшоты множественного выравнивания траекторий моделей белка с кристаллографической структурой белка Nip7 *P.abyssi* при разных значениях давления и температуры. Кристаллографическая структура белка Nip7 *P.abyssi* окрашена по вторичной структуре: бета листы - синим; альфа-спирали - красным; петли - зеленым. Модели, полученные с помощью моделирования молекулярной динамики, показаны серым цветом. (Б) Снэпшоты множественного выравнивания траекторий моделей белка с кристаллографической структурой белка Nip7 *P.furiosus* при разных значениях давления и температуры. Кристаллографическая структура белка Nip7 *P. furiosus* окрашена по вторичной структуре: бета листы - синим; альфа-спирали - красным; петли - зеленым. Модели, полученные с помощью моделирования молекулярной динамики, показаны серым цветом.

А

Б



**Рисунок 4.3:** (А) Графики зависимости значения RMSF от номера аминокислотного остатка при температуре 300 К. График значений RMSF для белка Nip7 *P.abyssii* синий, для *P.furiosus* зеленый. Красными пунктирными линиями показаны замены в белке *P.furiosus* относительно белка *P.abyssii*. (Б) Графики зависимости значения RMSF от номера аминокислотного остатка при температуре 373 К. График значений RMSF для белка Nip7 *P.abyssii* красный, для *P.furiosus* розовый. Вторичная структура белка схематично показана под графиками:  $\beta$ -листы – синие стрелки;  $\alpha$ -спирали – красные прямоугольники.

## Приложение №5

**Таблица 5.1.** Двухфакторный дисперсионный анализ влияния температуры и давления на изменения значения параметра RMSDL модели белка NIP7-ABY при всех параметрах моделирования.

Номер остатка	NIP7-ABY RMSDL											
	300K			373K			F (P)	F (T)	F (PxT)	F (P)	F (T)	F (PxT)
	0,1 МПа	50 МПа	100 МПа	0,1 МПа	50 МПа	100 МПа						
5	1,59	1,43	1,64	1,96	1,46	1,60	1,13	0,44	0,50	0	0	0
6	1,33	1,23	1,36	1,81	1,29	1,33	1,14	0,96	0,84	0	0	0
7	1,24	1,15	1,24	1,75	1,19	1,14	1,53	0,78	1,17	0	0	0
8	1,23	1,13	1,23	1,75	1,17	1,11	1,62	0,69	1,22	0	0	0
9	1,21	1,10	1,20	1,74	1,16	1,10	1,70	0,91	1,18	0	0	0
10	1,24	1,13	1,21	1,78	1,21	1,15	1,74	1,16	1,18	0	0	0
11	1,27	1,18	1,25	1,79	1,25	1,19	1,67	1,19	1,25	0	0	0
12	1,21	1,15	1,21	1,66	1,21	1,16	1,65	1,40	1,34	0	0	0
13	1,26	1,21	1,24	1,61	1,28	1,23	1,84	1,94	1,30	0	0	0
14	1,28	1,29	1,29	1,52	1,33	1,28	1,61	2,83	2,04	0	0	0
15	1,29	1,32	1,30	1,40	1,34	1,30	1,17	2,88	1,84	0	0	0
16	1,31	1,36	1,34	1,39	1,36	1,32	0,43	0,49	1,70	0	0	0
17	1,30	1,39	1,37	1,38	1,36	1,32	0,64	0,00	2,64	0	0	0
18	1,34	1,44	1,42	1,41	1,40	1,37	1,20	0,04	2,47	0	0	0
19	1,35	1,46	1,43	1,41	1,42	1,39	1,71	0,01	2,05	0	0	0
20	1,34	1,48	1,42	1,41	1,43	1,42	2,38	0,06	1,21	0	0	0
21	1,33	1,47	1,40	1,40	1,43	1,43	2,41	0,32	0,88	0	0	0
22	1,32	1,47	1,39	1,39	1,43	1,44	2,39	0,68	0,89	0	0	0
23	1,26	1,39	1,31	1,33	1,36	1,37	1,69	0,89	0,84	0	0	0
24	1,15	1,25	1,15	1,22	1,24	1,25	0,99	2,11	0,72	0	0	0
25	1,11	1,19	1,09	1,18	1,20	1,20	0,81	3,09	0,72	0	0	0
26	1,09	1,16	1,05	1,17	1,18	1,18	0,67	4,06	0,68	0	0	0
27	1,07	1,11	1,01	1,16	1,15	1,15	0,64	5,38	0,47	0	1	0
28	1,10	1,08	1,06	1,19	1,16	1,14	0,29	2,95	0,00	0	0	0
29	1,48	1,37	1,47	1,55	1,49	1,44	0,43	0,48	0,28	0	0	0
30	1,76	1,59	1,82	1,87	1,79	1,76	0,46	0,52	0,47	0	0	0
31	1,83	1,63	1,89	1,92	1,84	1,78	0,53	0,27	0,67	0	0	0
32	1,83	1,61	1,89	1,91	1,83	1,77	0,58	0,23	0,71	0	0	0
33	1,82	1,60	1,90	1,90	1,82	1,76	0,56	0,18	0,72	0	0	0
34	1,81	1,60	1,90	1,88	1,81	1,75	0,54	0,14	0,72	0	0	0
35	1,80	1,59	1,89	1,88	1,80	1,75	0,54	0,15	0,70	0	0	0
36	1,79	1,59	1,88	1,88	1,80	1,75	0,53	0,20	0,67	0	0	0
37	1,80	1,59	1,87	1,88	1,81	1,76	0,51	0,28	0,65	0	0	0
38	1,77	1,57	1,82	1,86	1,80	1,76	0,56	0,60	0,56	0	0	0
39	1,51	1,37	1,53	1,62	1,58	1,56	0,46	2,27	0,44	0	0	0
40	1,20	1,12	1,11	1,29	1,26	1,21	2,54	10,85	0,25	0	1	0
41	1,07	1,04	0,95	1,25	1,19	1,17	3,03	32,52	0,44	0	1	0
42	1,07	1,04	0,93	1,28	1,21	1,18	3,79	36,38	0,56	1	1	0

43	1,11	1,09	0,97	1,36	1,26	1,24	4,22	37,46	0,64	1	1	0
44	1,16	1,14	1,02	1,42	1,32	1,30	4,15	41,21	0,61	1	1	0
45	1,21	1,20	1,07	1,51	1,41	1,37	4,27	46,98	0,57	1	1	0
46	1,44	1,52	1,20	1,78	1,72	1,71	2,17	23,92	1,64	0	1	0
47	1,56	1,70	1,32	2,02	1,87	1,92	1,60	20,38	1,96	0	1	0
48	1,68	1,90	1,43	2,19	2,08	2,08	1,55	15,68	1,50	0	1	0
49	1,88	2,22	1,57	2,47	2,47	2,32	1,83	9,37	0,75	0	1	0
50	1,90	2,26	1,59	2,55	2,71	2,37	1,88	8,71	0,21	0	1	0
51	1,94	2,33	1,64	2,61	2,94	2,43	1,96	7,78	0,04	0	1	0
52	1,98	2,37	1,66	2,70	3,18	2,49	2,02	7,53	0,01	0	1	0
53	2,03	2,44	1,73	2,79	3,32	2,58	1,98	7,58	0,02	0	1	0
54	2,08	2,53	1,79	2,87	3,47	2,68	2,18	8,19	0,02	0	1	0
55	2,08	2,57	1,80	2,92	3,52	2,71	2,25	8,42	0,01	0	1	0
56	1,99	2,44	1,76	2,80	3,39	2,58	2,15	8,21	0,02	0	1	0
57	1,90	2,33	1,69	2,65	3,29	2,45	2,16	7,47	0,06	0	1	0
58	1,79	2,17	1,59	2,50	3,16	2,31	2,13	7,53	0,10	0	1	0
59	1,54	1,81	1,44	2,19	2,89	2,05	2,13	9,41	0,34	0	1	0
60	1,48	1,72	1,39	2,02	2,65	1,93	2,28	9,75	0,36	0	1	0
61	1,39	1,61	1,33	1,90	2,35	1,81	2,23	11,60	0,23	0	1	0
62	1,32	1,54	1,32	1,74	1,96	1,71	1,93	13,80	0,01	0	1	0
63	1,23	1,42	1,25	1,56	1,64	1,54	1,06	10,82	0,12	0	1	0
64	1,17	1,26	1,19	1,47	1,41	1,41	0,13	12,83	0,47	0	1	0
65	1,23	1,24	1,32	1,48	1,37	1,39	0,37	6,99	0,90	0	1	0
66	1,38	1,34	1,47	1,70	1,51	1,50	0,81	5,33	1,29	0	1	0
67	1,54	1,45	1,61	1,90	1,64	1,64	1,23	4,31	1,04	0	1	0
68	1,66	1,53	1,72	2,05	1,75	1,74	1,40	4,17	1,08	0	0	0
69	1,79	1,69	1,89	2,20	1,90	1,89	1,05	3,25	1,14	0	0	0
70	1,83	1,74	1,96	2,26	1,95	1,93	0,94	2,93	1,20	0	0	0
71	1,88	1,79	2,02	2,30	1,99	1,97	0,88	2,52	1,29	0	0	0
72	1,88	1,80	2,02	2,31	2,00	1,97	0,88	2,58	1,27	0	0	0
73	1,87	1,79	2,01	2,29	1,98	1,96	0,85	2,52	1,29	0	0	0
74	1,82	1,77	1,98	2,23	1,93	1,92	0,79	2,06	1,33	0	0	0
75	1,77	1,70	1,89	2,14	1,87	1,86	0,82	2,34	1,11	0	0	0
76	1,64	1,60	1,77	1,94	1,73	1,72	0,61	1,78	1,09	0	0	0
77	1,48	1,49	1,64	1,75	1,61	1,59	0,30	1,93	1,28	0	0	0
78	1,34	1,40	1,51	1,56	1,47	1,47	0,26	1,50	1,35	0	0	0
79	1,16	1,21	1,30	1,33	1,29	1,28	0,45	2,79	1,49	0	0	0
80	1,10	1,16	1,23	1,24	1,22	1,24	1,14	4,22	1,14	0	0	0
81	1,05	1,09	1,14	1,16	1,17	1,20	1,37	7,14	0,23	0	1	0
82	1,05	1,09	1,14	1,14	1,18	1,21	2,13	6,62	0,03	0	1	0
83	1,10	1,15	1,18	1,16	1,22	1,25	2,41	4,78	0,01	0	1	0
84	1,14	1,21	1,23	1,18	1,25	1,28	3,20	1,90	0,02	0	0	0
85	1,19	1,27	1,30	1,18	1,26	1,30	5,12	0,05	0,01	1	0	0
86	1,25	1,35	1,37	1,21	1,29	1,32	6,78	3,28	0,01	1	0	0
87	1,24	1,34	1,37	1,17	1,25	1,28	7,89	9,40	0,11	1	1	0
88	1,20	1,31	1,35	1,13	1,20	1,23	8,41	15,82	0,36	1	1	0

89	1,17	1,28	1,32	1,09	1,15	1,17	7,32	22,05	0,58	1	1	0
90	1,16	1,27	1,29	1,07	1,11	1,13	4,32	25,13	0,73	1	1	0
91	1,16	1,28	1,29	1,07	1,10	1,12	3,07	23,04	0,92	0	1	0
92	1,21	1,34	1,32	1,12	1,13	1,16	1,56	15,92	0,82	0	1	0
93	1,24	1,37	1,31	1,17	1,17	1,20	0,64	7,63	0,72	0	1	0
94	1,25	1,39	1,28	1,25	1,23	1,28	0,48	1,09	1,12	0	0	0
95	1,19	1,32	1,20	1,27	1,23	1,29	0,34	0,22	1,30	0	0	0
96	1,15	1,27	1,11	1,26	1,22	1,28	0,24	2,02	1,37	0	0	0
97	1,29	1,34	1,17	1,38	1,33	1,38	0,39	2,51	1,12	0	0	0
98	1,42	1,41	1,25	1,48	1,42	1,46	0,65	2,01	0,82	0	0	0
99	1,46	1,44	1,27	1,53	1,47	1,50	0,79	2,23	0,79	0	0	0
100	1,54	1,48	1,30	1,59	1,52	1,55	1,22	2,31	0,81	0	0	0
101	1,65	1,54	1,35	1,68	1,59	1,61	1,78	2,08	0,80	0	0	0
102	1,73	1,57	1,37	1,74	1,63	1,62	2,28	1,34	0,64	0	0	0
103	1,78	1,57	1,42	1,75	1,64	1,60	2,33	0,55	0,37	0	0	0
104	1,88	1,59	1,49	1,75	1,62	1,54	2,24	0,01	0,22	0	0	0
105	1,96	1,63	1,58	1,77	1,63	1,53	2,32	0,38	0,22	0	0	0
106	2,04	1,73	1,72	1,82	1,67	1,56	1,82	1,26	0,12	0	0	0
107	2,05	1,82	1,82	1,84	1,68	1,58	1,31	2,27	0,05	0	0	0
108	2,09	1,95	1,94	1,88	1,72	1,64	0,84	3,46	0,04	0	0	0
109	2,14	2,03	2,05	1,91	1,75	1,68	0,55	4,81	0,10	0	1	0
110	2,12	2,06	2,09	1,91	1,75	1,68	0,37	5,56	0,18	0	1	0
111	2,13	2,11	2,16	1,91	1,76	1,70	0,20	6,61	0,28	0	1	0
112	2,07	2,08	2,14	1,86	1,72	1,67	0,12	7,81	0,38	0	1	0
113	2,00	2,03	2,09	1,80	1,66	1,62	0,08	8,82	0,46	0	1	0
114	1,88	1,96	2,01	1,72	1,59	1,58	0,02	9,08	0,62	0	1	0
115	1,79	1,93	1,97	1,67	1,55	1,56	0,04	8,94	0,78	0	1	0
116	1,87	1,99	2,10	1,64	1,55	1,57	0,19	12,32	0,64	0	1	0
117	1,97	2,10	2,22	1,65	1,56	1,59	0,18	13,97	0,46	0	1	0
118	1,98	2,11	2,23	1,61	1,52	1,56	0,18	13,72	0,39	0	1	0
119	1,98	2,10	2,20	1,66	1,54	1,60	0,12	10,91	0,36	0	1	0
120	1,96	2,08	2,16	1,65	1,51	1,59	0,11	9,96	0,33	0	1	0
121	1,85	1,97	2,05	1,55	1,41	1,50	0,13	9,47	0,30	0	1	0
122	1,78	1,92	2,00	1,49	1,35	1,46	0,17	9,25	0,33	0	1	0
123	1,74	1,90	1,99	1,45	1,32	1,43	0,21	9,48	0,34	0	1	0
124	1,77	1,93	2,00	1,47	1,34	1,45	0,18	9,69	0,33	0	1	0
125	1,80	1,95	2,00	1,49	1,37	1,47	0,14	9,77	0,32	0	1	0
126	1,73	1,90	1,85	1,51	1,38	1,48	0,05	10,02	0,58	0	1	0
127	1,64	1,79	1,69	1,56	1,43	1,51	0,01	5,61	0,85	0	1	0
128	1,66	1,79	1,61	1,68	1,59	1,63	0,23	0,41	0,85	0	0	0
129	1,63	1,78	1,56	1,65	1,59	1,62	0,44	0,23	0,92	0	0	0
130	1,60	1,74	1,51	1,61	1,56	1,58	0,55	0,15	0,92	0	0	0
131	1,62	1,76	1,52	1,63	1,58	1,61	0,56	0,11	0,95	0	0	0
132	1,63	1,77	1,53	1,65	1,60	1,62	0,53	0,06	0,94	0	0	0
133	1,65	1,80	1,56	1,68	1,62	1,65	0,54	0,07	0,95	0	0	0
134	1,65	1,79	1,56	1,68	1,62	1,65	0,53	0,04	0,94	0	0	0

135	1,68	1,84	1,61	1,71	1,63	1,68	0,41	0,23	1,03	0	0	0
136	1,68	1,86	1,63	1,71	1,63	1,68	0,30	0,27	1,03	0	0	0
137	1,68	1,87	1,68	1,69	1,59	1,66	0,16	0,97	0,91	0	0	0
138	1,75	1,98	1,88	1,76	1,62	1,74	0,11	3,18	1,41	0	0	0
139	1,92	2,17	2,12	1,91	1,76	1,93	0,47	4,65	1,54	0	1	0
140	2,10	2,38	2,36	2,08	1,91	2,09	0,51	5,43	1,46	0	1	0
141	2,23	2,53	2,51	2,17	1,99	2,16	0,44	6,88	1,37	0	1	0
142	2,38	2,66	2,67	2,27	2,08	2,22	0,31	8,49	1,17	0	1	0
143	2,48	2,74	2,78	2,34	2,13	2,27	0,26	9,16	1,05	0	1	0
144	2,52	2,80	2,85	2,37	2,16	2,30	0,26	9,41	1,05	0	1	0
145	2,51	2,77	2,85	2,35	2,15	2,27	0,27	9,53	1,02	0	1	0
146	2,50	2,73	2,83	2,34	2,14	2,24	0,23	9,74	0,99	0	1	0
147	2,43	2,65	2,76	2,31	2,12	2,21	0,28	9,09	1,07	0	1	0
148	2,31	2,49	2,63	2,22	2,20	2,07	0,17	5,39	1,02	0	1	0

**Таблица 5.2.** Двухфакторный дисперсионный анализ влияния температуры и давления на изменения значения параметра RMSDL модели белка NIP7-FUR при всех параметрах моделирования.

Номер остатка	NIP7-FUR RMSDL											
	300K			373K			F (P)	F (T)	F (PxT)	F (P)	F (T)	F (PxT)
	0,1 МПа	50 МПа	100 МПа	0,1 МПа	50 МПа	100 МПа						
5	1,70	1,59	2,14	2,05	1,90	1,92	1,04	0,84	1,28	0	0	0
6	1,45	1,44	1,80	1,67	1,57	1,55	1,49	0,18	3,08	0	0	0
7	1,25	1,25	1,40	1,40	1,28	1,23	1,18	0,00	7,39	0	0	1
8	1,18	1,20	1,32	1,33	1,21	1,14	0,79	0,06	7,37	0	0	1
9	1,13	1,15	1,25	1,28	1,15	1,09	0,91	0,00	7,41	0	0	1
10	1,17	1,18	1,26	1,30	1,19	1,13	1,25	0,06	6,98	0	0	1
11	1,23	1,24	1,30	1,35	1,24	1,20	1,38	0,09	6,37	0	0	1
12	1,18	1,16	1,23	1,28	1,20	1,17	2,02	1,72	4,93	0	0	1
13	1,21	1,18	1,23	1,30	1,23	1,22	1,97	3,83	2,36	0	0	0
14	1,27	1,24	1,26	1,32	1,28	1,28	0,85	2,92	0,31	0	0	0
15	1,30	1,29	1,29	1,33	1,31	1,31	0,22	1,27	0,03	0	0	0
16	1,36	1,36	1,35	1,38	1,36	1,37	0,14	0,26	0,09	0	0	0
17	1,39	1,40	1,38	1,41	1,38	1,39	0,09	0,00	0,14	0	0	0
18	1,48	1,48	1,46	1,47	1,45	1,47	0,08	0,05	0,15	0	0	0
19	1,52	1,52	1,50	1,51	1,49	1,51	0,02	0,09	0,14	0	0	0
20	1,53	1,54	1,53	1,54	1,53	1,55	0,01	0,03	0,07	0	0	0
21	1,51	1,51	1,51	1,52	1,52	1,54	0,04	0,56	0,05	0	0	0
22	1,50	1,50	1,51	1,52	1,52	1,54	0,11	0,84	0,03	0	0	0
23	1,46	1,46	1,47	1,47	1,48	1,49	0,09	0,46	0,01	0	0	0
24	1,35	1,35	1,36	1,37	1,38	1,38	0,08	0,92	0,03	0	0	0
25	1,29	1,27	1,31	1,33	1,33	1,33	0,19	2,87	0,19	0	0	0
26	1,25	1,21	1,27	1,31	1,30	1,29	0,44	5,22	0,55	0	1	0
27	1,22	1,17	1,23	1,29	1,28	1,27	0,48	7,10	0,67	0	1	0
28	1,23	1,22	1,21	1,29	1,30	1,25	0,32	2,44	0,08	0	0	0
29	1,56	1,67	1,48	1,53	1,54	1,44	3,06	2,23	0,44	0	0	0

30	1,82	1,93	1,66	1,74	1,71	1,61	3,73	3,87	0,80	1	0	0
31	1,91	2,07	1,72	1,78	1,76	1,64	4,72	7,97	1,20	1	1	0
32	1,92	2,09	1,72	1,78	1,75	1,64	5,10	8,68	1,40	1	1	0
33	1,91	2,08	1,71	1,77	1,75	1,64	4,83	7,63	1,41	1	1	0
34	1,90	2,07	1,70	1,77	1,74	1,63	4,65	7,08	1,39	1	1	0
35	1,89	2,07	1,69	1,75	1,73	1,62	4,57	6,97	1,40	1	1	0
36	1,87	2,06	1,67	1,73	1,72	1,61	4,62	7,12	1,44	1	1	0
37	1,86	2,05	1,67	1,73	1,72	1,60	4,65	6,87	1,46	1	1	0
38	1,81	1,98	1,66	1,71	1,68	1,58	4,35	7,25	1,45	1	1	0
39	1,54	1,62	1,45	1,54	1,48	1,41	3,47	2,13	1,06	1	0	0
40	1,22	1,31	1,26	1,34	1,29	1,22	1,19	0,36	2,45	0	0	0
41	1,05	1,10	1,18	1,36	1,24	1,17	0,25	10,99	4,30	0	1	1
42	1,06	1,09	1,20	1,41	1,26	1,18	0,38	10,31	4,17	0	1	1
43	1,13	1,16	1,27	1,48	1,32	1,23	0,40	7,39	3,67	0	1	1
44	1,18	1,22	1,33	1,56	1,38	1,29	0,51	7,60	3,89	0	1	1
45	1,22	1,26	1,42	1,66	1,45	1,37	0,51	7,86	4,43	0	1	1
46	1,32	1,36	1,63	1,87	1,71	1,61	0,42	12,52	4,04	0	1	1
47	1,43	1,44	1,85	2,35	1,88	1,77	1,49	15,64	7,17	0	1	1
48	1,52	1,53	2,04	2,74	2,10	2,01	2,15	21,52	8,09	0	1	1
49	1,68	1,67	2,24	3,09	2,51	2,26	1,48	28,84	8,37	0	1	1
50	1,73	1,68	2,29	3,30	2,74	2,38	1,13	29,70	6,83	0	1	1
51	1,83	1,71	2,38	3,45	2,93	2,51	0,94	26,28	5,32	0	1	1
52	1,87	1,71	2,44	3,69	3,18	2,68	0,72	25,21	4,16	0	1	1
53	1,92	1,72	2,51	3,85	3,31	2,76	0,71	24,08	3,96	0	1	1
54	1,98	1,76	2,55	3,92	3,39	2,82	0,71	24,29	3,87	0	1	1
55	1,99	1,76	2,53	3,96	3,42	2,83	0,80	26,15	4,01	0	1	1
56	1,94	1,71	2,43	3,88	3,32	2,74	0,89	24,62	3,71	0	1	1
57	1,87	1,65	2,28	3,62	3,22	2,64	0,60	22,76	2,89	0	1	0
58	1,78	1,54	2,11	3,33	3,06	2,45	0,49	20,32	2,45	0	1	0
59	1,60	1,33	1,85	2,97	2,73	2,21	0,50	18,86	2,06	0	1	0
60	1,49	1,25	1,74	2,66	2,46	2,02	0,45	17,94	2,06	0	1	0
61	1,35	1,17	1,58	2,41	2,19	1,83	0,54	21,59	2,43	0	1	0
62	1,28	1,17	1,47	2,01	1,81	1,57	1,21	32,54	5,44	0	1	1
63	1,20	1,16	1,35	1,64	1,50	1,40	1,17	31,58	5,90	0	1	1
64	1,16	1,16	1,36	1,52	1,38	1,36	1,76	18,98	5,84	0	1	1
65	1,29	1,28	1,58	1,45	1,37	1,43	3,70	0,25	2,86	1	0	0
66	1,48	1,44	1,90	1,63	1,50	1,62	3,16	0,05	1,75	0	0	0
67	1,72	1,65	2,18	1,88	1,70	1,91	3,00	0,02	1,05	0	0	0
68	1,89	1,82	2,40	2,06	1,85	2,09	2,84	0,06	0,98	0	0	0
69	2,06	2,02	2,58	2,23	2,01	2,25	2,63	0,14	1,03	0	0	0
70	2,13	2,11	2,65	2,31	2,08	2,31	2,51	0,18	1,07	0	0	0
71	2,17	2,16	2,69	2,35	2,12	2,35	2,48	0,25	1,10	0	0	0
72	2,17	2,16	2,69	2,35	2,12	2,35	2,50	0,25	1,09	0	0	0
73	2,15	2,14	2,67	2,32	2,09	2,33	2,49	0,26	1,06	0	0	0
74	2,09	2,08	2,61	2,24	2,03	2,27	2,59	0,32	1,02	0	0	0
75	2,01	2,00	2,47	2,16	1,96	2,18	2,54	0,20	0,98	0	0	0

76	1,87	1,90	2,23	2,00	1,83	2,01	2,24	0,24	0,98	0	0	0
77	1,65	1,72	1,92	1,77	1,64	1,74	1,68	0,51	1,59	0	0	0
78	1,44	1,54	1,62	1,54	1,45	1,50	0,82	0,54	2,25	0	0	0
79	1,21	1,29	1,34	1,30	1,26	1,28	0,79	0,00	2,09	0	0	0
80	1,12	1,18	1,25	1,22	1,20	1,22	1,60	1,26	1,39	0	0	0
81	1,05	1,08	1,16	1,16	1,15	1,17	2,12	5,11	1,00	0	1	0
82	1,08	1,09	1,20	1,18	1,18	1,21	2,60	5,50	0,94	0	1	0
83	1,13	1,13	1,23	1,22	1,23	1,25	2,32	6,30	0,78	0	1	0
84	1,17	1,18	1,26	1,26	1,27	1,29	1,90	6,52	0,61	0	1	0
85	1,19	1,20	1,27	1,28	1,28	1,31	1,45	5,52	0,33	0	1	0
86	1,24	1,25	1,31	1,31	1,32	1,34	1,30	4,40	0,23	0	1	0
87	1,25	1,27	1,31	1,31	1,31	1,34	1,19	2,76	0,10	0	0	0
88	1,23	1,25	1,29	1,29	1,29	1,32	1,07	2,44	0,10	0	0	0
89	1,21	1,23	1,26	1,26	1,25	1,28	0,85	0,92	0,12	0	0	0
90	1,22	1,25	1,25	1,24	1,22	1,26	0,29	0,00	0,31	0	0	0
91	1,29	1,36	1,32	1,29	1,26	1,31	0,16	1,02	0,71	0	0	0
92	1,50	1,59	1,49	1,47	1,43	1,49	0,15	2,09	1,32	0	0	0
93	1,65	1,77	1,65	1,64	1,60	1,68	0,17	0,84	1,33	0	0	0
94	1,72	1,85	1,73	1,75	1,70	1,79	0,14	0,11	1,11	0	0	0
95	1,73	1,87	1,76	1,78	1,72	1,81	0,13	0,05	1,13	0	0	0
96	1,74	1,88	1,76	1,80	1,75	1,84	0,14	0,01	1,03	0	0	0
97	1,83	1,95	1,86	1,93	1,89	1,97	0,13	0,66	0,77	0	0	0
98	1,89	2,00	1,92	2,02	1,97	2,05	0,14	1,62	0,78	0	0	0
99	1,94	2,05	1,96	2,08	2,04	2,11	0,12	2,45	0,74	0	0	0
100	2,03	2,13	2,06	2,19	2,15	2,22	0,10	3,97	0,57	0	0	0
101	2,08	2,16	2,11	2,28	2,25	2,30	0,08	7,41	0,37	0	1	0
102	2,08	2,16	2,12	2,32	2,29	2,31	0,05	9,90	0,26	0	1	0
103	2,05	2,14	2,09	2,29	2,26	2,26	0,10	9,11	0,34	0	1	0
104	2,15	2,28	2,17	2,35	2,31	2,29	0,45	4,03	0,58	0	0	0
105	2,24	2,38	2,24	2,39	2,37	2,33	0,74	1,64	0,61	0	0	0
106	2,38	2,58	2,36	2,49	2,44	2,41	1,12	0,01	1,11	0	0	0
107	2,47	2,72	2,43	2,53	2,46	2,44	1,19	0,57	1,49	0	0	0
108	2,63	2,93	2,58	2,64	2,56	2,57	1,04	1,60	1,54	0	0	0
109	2,72	3,04	2,65	2,69	2,60	2,62	0,95	2,30	1,56	0	0	0
110	2,71	3,05	2,63	2,64	2,55	2,58	0,93	2,94	1,61	0	0	0
111	2,74	3,09	2,63	2,62	2,52	2,57	0,88	3,84	1,58	0	0	0
112	2,66	3,02	2,55	2,53	2,42	2,48	0,83	4,23	1,60	0	0	0
113	2,58	2,93	2,46	2,43	2,32	2,40	0,77	4,33	1,62	0	1	0
114	2,43	2,75	2,30	2,26	2,17	2,26	0,65	3,86	1,53	0	0	0
115	2,37	2,68	2,23	2,21	2,12	2,22	0,63	3,75	1,64	0	0	0
116	2,73	2,89	2,51	2,33	2,29	2,37	0,52	10,20	1,25	0	1	0
117	2,91	3,03	2,64	2,40	2,38	2,45	0,60	13,30	1,28	0	1	0
118	2,95	3,04	2,65	2,46	2,45	2,51	0,73	11,85	1,39	0	1	0
119	2,95	3,04	2,64	2,56	2,52	2,58	0,90	8,06	1,48	0	1	0
120	2,96	3,05	2,65	2,61	2,56	2,62	0,95	6,98	1,50	0	1	0
121	2,87	2,95	2,58	2,53	2,47	2,52	0,96	7,78	1,46	0	1	0

122	2,83	2,90	2,54	2,48	2,42	2,47	0,92	8,15	1,39	0	1	0
123	2,81	2,87	2,52	2,46	2,39	2,45	0,90	8,12	1,33	0	1	0
124	2,83	2,89	2,54	2,48	2,41	2,47	0,89	7,90	1,32	0	1	0
125	2,83	2,89	2,56	2,50	2,43	2,49	0,80	7,86	1,29	0	1	0
126	2,46	2,64	2,29	2,39	2,27	2,36	0,75	1,99	2,10	0	0	0
127	2,22	2,43	2,15	2,33	2,19	2,29	0,52	0,00	2,85	0	0	0
128	2,18	2,39	2,18	2,39	2,24	2,33	0,26	1,16	2,77	0	0	0
129	2,18	2,35	2,19	2,32	2,20	2,28	0,19	0,22	2,26	0	0	0
130	2,11	2,27	2,13	2,23	2,12	2,19	0,13	0,03	2,02	0	0	0
131	2,16	2,30	2,16	2,29	2,18	2,26	0,10	0,36	1,76	0	0	0
132	2,20	2,34	2,20	2,35	2,25	2,33	0,09	1,07	1,65	0	0	0
133	2,27	2,42	2,27	2,43	2,32	2,40	0,11	1,03	1,66	0	0	0
134	2,28	2,43	2,27	2,42	2,32	2,40	0,14	0,77	1,75	0	0	0
135	2,36	2,53	2,33	2,48	2,37	2,45	0,24	0,12	1,68	0	0	0
136	2,42	2,59	2,35	2,49	2,38	2,45	0,34	0,01	1,31	0	0	0
137	2,52	2,71	2,42	2,54	2,43	2,49	0,37	0,38	1,03	0	0	0
138	2,58	2,83	2,45	2,51	2,40	2,48	0,52	1,80	1,36	0	0	0
139	2,77	3,08	2,64	2,65	2,52	2,61	0,50	2,76	1,27	0	0	0
140	3,05	3,40	2,90	2,90	2,76	2,84	0,52	2,95	1,23	0	0	0
141	3,18	3,58	3,03	3,02	2,86	2,95	0,58	3,28	1,29	0	0	0
142	3,38	3,83	3,22	3,15	2,99	3,07	0,66	4,66	1,37	0	1	0
143	3,54	4,02	3,37	3,27	3,09	3,18	0,70	5,55	1,39	0	1	0
144	3,63	4,13	3,45	3,34	3,16	3,24	0,69	5,69	1,37	0	1	0
145	3,59	4,10	3,43	3,32	3,13	3,21	0,70	5,65	1,40	0	1	0
146	3,52	4,03	3,36	3,29	3,09	3,17	0,74	5,35	1,49	0	1	0
147	3,36	3,86	3,21	3,20	2,99	3,07	0,76	4,36	1,64	0	1	0
148	3,22	3,69	3,07	3,21	2,92	3,03	0,66	2,38	1,93	0	0	0

## Приложение №6

**Таблица 6.1.** Двухфакторный дисперсионный анализ влияния температуры и давления на изменения значения параметра RMSF модели белка NIP7-ABY при всех параметрах моделирования.

Номер остатка	NIP7-ABY RMSF											
	300K			373K			F (P)	F (T)	F (PxT)	F (P)	F (T)	F (PxT)
	0,1 МПа	50 МПа	100 МПа	0,1 МПа	50 МПа	100 МПа						
1	1,63	1,71	1,40	2,08	2,01	1,94	1,44	17,18	0,45	0	1	0
2	1,10	1,11	0,94	1,34	1,39	1,28	1,14	12,88	0,14	0	1	0
3	0,66	0,65	0,63	0,83	0,84	0,79	0,66	30,42	0,05	0	1	0
4	0,59	0,59	0,57	0,80	0,75	0,72	0,91	38,32	0,38	0	1	0
5	0,58	0,59	0,54	0,78	0,73	0,72	1,81	75,00	0,93	0	1	0
6	0,55	0,56	0,52	0,80	0,71	0,69	3,56	85,31	2,09	1	1	0
7	0,69	0,70	0,67	1,08	0,90	0,88	2,96	44,61	2,50	0	1	0
8	0,86	0,78	0,73	1,22	1,02	1,05	4,17	43,67	0,59	1	1	0
9	0,91	0,84	0,76	1,41	1,15	1,18	3,69	41,29	0,71	1	1	0
10	0,63	0,60	0,57	0,99	0,80	0,82	3,03	38,19	1,13	0	1	0
11	0,59	0,53	0,49	0,77	0,68	0,67	6,66	54,75	0,13	1	1	0
12	0,71	0,61	0,56	0,84	0,79	0,79	5,80	48,74	1,18	1	1	0
13	0,64	0,59	0,58	0,80	0,76	0,75	2,18	52,84	0,01	0	1	0
14	0,51	0,49	0,49	0,67	0,65	0,63	1,38	101,09	0,20	0	1	0
15	0,58	0,54	0,52	0,72	0,70	0,66	5,30	93,43	0,43	1	1	0
16	0,69	0,65	0,63	0,86	0,86	0,79	2,85	59,05	0,29	0	1	0
17	0,61	0,62	0,61	0,80	0,78	0,73	0,97	61,62	0,92	0	1	0
18	0,59	0,60	0,56	0,73	0,72	0,70	1,78	85,22	0,14	0	1	0
19	0,66	0,64	0,62	0,80	0,78	0,75	2,85	73,27	0,01	0	1	0
20	0,64	0,65	0,61	0,79	0,77	0,74	1,35	41,01	0,24	0	1	0
21	0,58	0,58	0,60	0,71	0,71	0,70	0,02	42,07	0,38	0	1	0
22	0,64	0,64	0,61	0,80	0,81	0,77	1,53	74,73	0,02	0	1	0
23	0,73	0,70	0,64	0,86	0,87	0,82	3,45	57,16	0,44	1	1	0
24	0,66	0,60	0,56	0,81	0,81	0,79	2,76	80,71	1,04	0	1	0
25	0,79	0,89	0,63	1,05	1,12	1,09	1,00	13,29	0,66	0	1	0
26	0,67	0,71	0,60	0,86	0,86	0,82	1,73	25,15	0,29	0	1	0
27	0,74	0,73	0,59	0,93	0,92	0,89	2,94	44,87	1,01	0	1	0
28	0,59	0,59	0,52	0,76	0,72	0,71	2,22	43,33	0,46	0	1	0
29	0,48	0,46	0,41	0,62	0,59	0,55	7,76	100,91	0,01	1	1	0
30	0,46	0,46	0,43	0,62	0,60	0,56	2,56	63,49	0,28	0	1	0
31	0,50	0,47	0,51	0,63	0,63	0,57	0,63	34,25	2,24	0	1	0
32	0,68	0,63	0,63	0,79	0,81	0,77	0,51	27,47	0,63	0	1	0
33	0,96	0,92	0,89	1,16	1,16	1,09	0,58	16,34	0,05	0	1	0
34	1,36	1,45	1,39	1,68	1,68	1,58	0,71	19,78	0,50	0	1	0
35	1,52	1,69	1,59	1,98	2,02	1,87	1,22	25,17	0,56	0	1	0
36	1,26	1,27	1,31	1,41	1,54	1,30	0,65	3,41	1,22	0	0	0
37	0,80	0,75	0,76	0,97	1,01	0,86	0,85	11,90	0,70	0	1	0
38	0,65	0,62	0,63	0,80	0,83	0,74	0,57	23,41	0,83	0	1	0

39	0,49	0,47	0,49	0,62	0,62	0,57	0,77	50,30	1,51	0	1	0
40	0,50	0,49	0,47	0,60	0,63	0,59	1,25	60,04	0,64	0	1	0
41	0,56	0,56	0,50	0,67	0,67	0,65	1,66	43,17	0,55	0	1	0
42	0,61	0,64	0,57	0,77	0,75	0,75	1,07	39,49	0,57	0	1	0
43	0,81	0,82	0,77	1,05	1,02	1,02	0,44	45,41	0,22	0	1	0
44	0,94	0,95	0,89	1,22	1,17	1,17	0,65	56,89	0,46	0	1	0
45	1,05	1,14	1,02	1,41	1,32	1,36	0,44	56,63	2,14	0	1	0
46	0,78	0,84	0,76	1,12	1,07	1,07	0,56	80,75	0,94	0	1	0
47	0,68	0,73	0,68	0,95	0,88	0,88	0,81	76,20	1,91	0	1	0
48	0,92	1,02	0,91	1,34	1,23	1,22	1,16	58,96	2,00	0	1	0
49	0,94	1,04	0,97	1,36	1,28	1,22	0,79	44,05	1,64	0	1	0
50	0,77	0,83	0,76	1,21	1,12	1,03	1,75	56,87	1,63	0	1	0
51	1,13	1,37	1,09	1,80	1,57	1,50	2,26	30,66	2,95	0	1	0
52	1,24	1,33	1,29	2,22	1,82	1,63	1,79	26,31	2,63	0	1	0
53	1,22	1,24	1,11	2,06	1,84	1,58	3,26	44,37	1,36	0	1	0
54	1,37	1,44	1,13	2,42	2,11	1,70	5,44	38,52	1,39	1	1	0
55	1,18	1,22	0,98	2,12	1,89	1,48	5,50	41,98	1,41	1	1	0
56	1,23	1,29	1,05	1,92	1,91	1,56	2,79	28,49	0,21	0	1	0
57	1,28	1,36	1,07	2,32	1,94	1,76	1,76	20,31	0,66	0	1	0
58	1,61	1,61	1,37	2,44	2,00	2,01	1,88	19,29	0,82	0	1	0
59	1,42	1,32	1,18	1,77	2,03	1,63	1,71	16,87	0,74	0	1	0
60	0,91	0,84	0,78	1,46	1,34	1,26	2,18	58,10	0,08	0	1	0
61	0,99	0,96	0,91	1,35	1,28	1,42	0,16	25,94	0,51	0	1	0
62	0,82	0,83	0,73	1,01	0,99	0,95	2,61	40,12	0,35	0	1	0
63	0,70	0,70	0,66	0,87	0,87	0,83	1,29	47,80	0,01	0	1	0
64	0,61	0,62	0,60	0,78	0,77	0,73	1,20	58,64	0,44	0	1	0
65	0,63	0,63	0,65	0,81	0,80	0,76	0,26	39,04	0,72	0	1	0
66	0,64	0,64	0,65	0,85	0,85	0,78	0,56	50,85	0,99	0	1	0
67	0,68	0,68	0,69	0,91	0,89	0,83	0,58	56,67	0,99	0	1	0
68	0,91	0,92	0,91	1,24	1,24	1,14	0,77	53,25	0,67	0	1	0
69	1,16	1,12	1,08	1,61	1,60	1,49	1,56	87,74	0,18	0	1	0
70	1,39	1,33	1,25	2,06	1,88	1,83	2,41	70,77	0,25	0	1	0
71	1,97	1,82	1,68	2,78	2,56	2,54	2,57	67,07	0,12	0	1	0
72	2,12	1,83	1,69	2,61	2,41	2,41	3,09	29,31	0,39	0	1	0
73	1,76	1,67	1,54	2,34	2,19	2,13	2,46	53,90	0,07	0	1	0
74	1,32	1,32	1,26	1,77	1,69	1,61	1,19	48,22	0,32	0	1	0
75	0,99	0,99	0,95	1,36	1,31	1,24	1,22	55,61	0,29	0	1	0
76	0,84	0,86	0,79	1,17	1,07	1,06	1,80	57,61	0,94	0	1	0
77	0,67	0,68	0,64	0,92	0,85	0,83	1,66	56,65	0,73	0	1	0
78	0,72	0,72	0,72	0,99	0,94	0,90	0,98	59,19	0,77	0	1	0
79	0,68	0,67	0,67	0,89	0,87	0,82	0,53	50,43	0,50	0	1	0
80	0,74	0,74	0,75	0,97	0,95	0,91	0,29	46,08	0,60	0	1	0
81	0,75	0,73	0,79	1,03	0,99	0,94	0,26	45,26	1,32	0	1	0
82	0,72	0,73	0,73	0,94	0,93	0,89	0,21	43,63	0,56	0	1	0
83	0,61	0,62	0,60	0,77	0,79	0,74	0,65	48,18	0,11	0	1	0
84	0,70	0,68	0,69	0,89	0,91	0,85	0,34	34,46	0,38	0	1	0

85	0,80	0,77	0,79	1,00	1,02	0,97	0,11	37,38	0,39	0	1	0
86	0,66	0,64	0,62	0,83	0,85	0,79	0,86	48,09	0,29	0	1	0
87	0,64	0,61	0,59	0,80	0,83	0,78	0,70	57,84	0,44	0	1	0
88	0,69	0,67	0,65	0,85	0,86	0,85	0,37	49,25	0,24	0	1	0
89	0,61	0,63	0,63	0,79	0,79	0,78	0,07	42,31	0,18	0	1	0
90	0,67	0,71	0,69	0,85	0,83	0,82	0,13	28,91	0,45	0	1	0
91	0,61	0,66	0,68	0,77	0,75	0,75	0,17	11,01	0,67	0	1	0
92	0,54	0,59	0,59	0,68	0,65	0,65	0,10	12,75	1,04	0	1	0
93	0,45	0,50	0,48	0,57	0,54	0,53	0,29	23,11	2,14	0	1	0
94	0,42	0,42	0,40	0,52	0,49	0,49	1,94	60,29	0,50	0	1	0
95	0,55	0,54	0,48	0,66	0,61	0,62	2,78	40,10	1,53	0	1	0
96	0,59	0,57	0,54	0,71	0,68	0,66	2,40	34,44	0,05	0	1	0
97	0,85	0,86	0,78	1,07	1,00	0,99	2,13	45,46	0,65	0	1	0
98	1,08	1,17	1,04	1,55	1,51	1,50	1,05	106,85	0,98	0	1	0
99	1,16	1,30	1,23	1,80	1,76	1,77	0,31	129,15	1,17	0	1	0
100	0,78	0,86	0,78	1,29	1,24	1,24	0,24	109,89	0,77	0	1	0
101	0,78	0,79	0,76	1,11	1,03	1,02	0,87	74,27	0,83	0	1	0
102	1,05	1,05	1,03	1,44	1,34	1,34	0,63	53,78	0,39	0	1	0
103	0,94	0,98	0,97	1,40	1,33	1,34	0,09	81,15	0,61	0	1	0
104	0,79	0,77	0,77	1,12	1,06	1,07	0,67	91,75	0,26	0	1	0
105	1,09	1,04	1,02	1,47	1,35	1,33	2,34	62,36	0,28	0	1	0
106	1,23	1,20	1,18	1,69	1,57	1,54	1,68	68,15	0,46	0	1	0
107	1,26	1,16	1,16	1,64	1,56	1,51	1,69	48,03	0,06	0	1	0
108	1,05	0,98	1,01	1,45	1,39	1,31	1,52	77,49	0,66	0	1	0
109	0,92	0,81	0,88	1,23	1,16	1,10	2,34	57,17	0,82	0	1	0
110	0,79	0,69	0,77	1,06	1,00	0,92	2,12	49,56	1,84	0	1	0
111	0,81	0,81	0,83	1,14	1,10	1,07	0,16	67,69	0,56	0	1	0
112	0,80	0,84	0,81	1,12	1,08	1,10	0,00	65,65	0,45	0	1	0
113	0,98	1,00	0,97	1,32	1,23	1,27	0,18	40,62	0,50	0	1	0
114	0,84	0,88	0,84	1,12	1,13	1,12	0,23	71,75	0,11	0	1	0
115	0,70	0,69	0,64	0,89	0,85	0,88	0,57	64,88	0,98	0	1	0
116	0,84	0,85	0,77	1,06	0,99	1,04	0,78	44,58	1,24	0	1	0
117	0,77	0,77	0,71	0,96	0,90	0,98	0,36	48,69	2,08	0	1	0
118	0,64	0,64	0,60	0,80	0,72	0,79	0,95	40,95	2,34	0	1	0
119	0,64	0,68	0,67	0,82	0,79	0,81	0,07	25,76	0,66	0	1	0
120	0,72	0,75	0,78	0,89	0,86	0,92	0,52	13,71	0,20	0	1	0
121	1,13	1,15	1,16	1,14	1,15	1,23	0,10	0,05	0,05	0	0	0
122	1,21	1,28	1,33	1,48	1,45	1,56	0,34	4,82	0,08	0	1	0
123	1,04	1,11	1,08	1,20	1,13	1,22	0,07	2,11	0,33	0	0	0
124	1,06	1,09	1,09	1,34	1,31	1,40	0,25	22,76	0,26	0	1	0
125	0,79	0,81	0,79	0,98	0,94	0,93	0,19	18,14	0,35	0	1	0
126	0,56	0,58	0,59	0,69	0,67	0,66	0,00	26,24	0,93	0	1	0
127	0,51	0,55	0,58	0,64	0,62	0,61	0,26	12,63	1,79	0	1	0
128	0,47	0,48	0,47	0,58	0,56	0,53	0,85	29,84	0,95	0	1	0
129	0,58	0,61	0,54	0,72	0,68	0,68	1,33	25,86	1,05	0	1	0
130	0,77	0,79	0,68	0,92	0,86	0,86	2,06	19,39	1,05	0	1	0

131	1,10	1,19	1,07	1,24	1,20	1,20	0,43	3,04	0,53	0	0	0
132	1,34	1,32	1,18	1,55	1,52	1,56	0,69	26,18	1,19	0	1	0
133	1,37	1,33	1,28	1,57	1,65	1,64	0,05	15,21	0,38	0	1	0
134	1,05	1,06	0,97	1,27	1,26	1,24	0,66	26,44	0,20	0	1	0
135	0,77	0,82	0,75	0,96	0,93	0,92	0,50	17,64	0,41	0	1	0
136	0,80	0,79	0,75	0,98	0,93	0,90	1,20	21,39	0,14	0	1	0
137	0,76	0,75	0,78	0,97	0,90	0,89	0,35	17,57	0,68	0	1	0
138	0,72	0,74	0,77	0,90	0,86	0,83	0,04	13,75	1,14	0	1	0
139	0,68	0,70	0,72	0,88	0,85	0,81	0,12	33,02	1,14	0	1	0
140	0,80	0,83	0,78	1,02	0,99	0,97	0,38	28,14	0,26	0	1	0
141	0,78	0,83	0,77	1,02	0,97	0,98	0,15	24,41	0,58	0	1	0
142	0,97	1,09	0,98	1,27	1,22	1,21	0,69	21,68	1,05	0	1	0
143	1,51	1,73	1,59	2,05	1,87	1,92	0,08	14,14	1,65	0	1	0
144	1,54	1,73	1,58	2,22	2,08	2,09	0,29	45,90	1,70	0	1	0
145	1,25	1,33	1,23	1,76	1,65	1,67	0,28	53,02	0,95	0	1	0
146	1,11	1,19	1,17	1,55	1,47	1,52	0,02	45,56	0,74	0	1	0
147	1,07	1,11	1,11	1,57	1,45	1,46	0,22	52,10	0,82	0	1	0
148	0,92	0,93	0,94	1,28	1,23	1,21	0,12	51,66	0,46	0	1	0
149	0,73	0,78	0,77	0,96	0,98	0,97	0,29	31,31	0,08	0	1	0
150	0,65	0,65	0,69	0,83	0,83	0,80	0,01	32,18	0,59	0	1	0
151	0,83	0,81	0,87	1,13	1,04	1,04	0,49	29,57	0,76	0	1	0
152	0,87	0,90	1,01	1,24	1,17	1,13	0,11	15,42	1,26	0	1	0
153	1,08	1,14	1,27	1,61	1,62	1,46	0,05	19,15	1,28	0	1	0
154	1,69	1,83	2,01	3,08	2,54	2,62	0,32	19,26	1,40	0	1	0
155	2,51	2,80	3,12	5,05	3,99	4,10	0,23	11,34	1,10	0	1	0

**Таблица 6.2.** Двухфакторный дисперсионный анализ влияния температуры и давления на изменения значения параметра RMSF модели белка NIP7-FUR при всех параметрах моделирования.

Номер остатка	NIP7-FUR RMSF											
	300K			373K			F (P)	F (T)	F (PxT)	F (P)	F (T)	F (PxT)
	0,1 МПа	50 МПа	100 МПа	0,1 МПа	50 МПа	100 МПа						
1	1,47	1,31	1,71	2,53	2,08	1,95	0,94	14,54	1,77	0	1	0
2	0,92	1,00	1,14	1,60	1,40	1,45	0,42	26,89	1,58	0	1	0
3	0,64	0,63	0,69	0,88	0,86	0,83	0,15	57,07	1,19	0	1	0
4	0,56	0,56	0,60	0,75	0,76	0,75	0,52	121,44	1,11	0	1	0
5	0,57	0,57	0,60	0,75	0,76	0,74	0,19	130,91	1,48	0	1	0
6	0,60	0,56	0,59	0,73	0,75	0,74	0,14	86,65	0,73	0	1	0
7	0,75	0,70	0,76	1,03	0,95	0,94	0,98	39,71	0,76	0	1	0
8	0,81	0,75	0,84	1,15	1,05	1,02	1,04	41,20	1,31	0	1	0
9	0,82	0,78	0,85	1,17	1,04	1,02	1,30	34,70	1,46	0	1	0
10	0,61	0,57	0,62	0,84	0,77	0,75	1,40	47,90	1,06	0	1	0
11	0,52	0,48	0,52	0,65	0,66	0,64	0,72	177,32	3,83	0	1	1
12	0,60	0,55	0,60	0,76	0,74	0,73	1,67	154,70	1,55	0	1	0
13	0,62	0,57	0,61	0,78	0,77	0,76	2,03	208,37	1,87	0	1	0
14	0,55	0,51	0,51	0,66	0,65	0,65	2,62	175,35	1,67	0	1	0

15	0,58	0,53	0,54	0,70	0,70	0,68	2,54	181,42	1,53	0	1	0
16	0,70	0,65	0,65	0,86	0,86	0,85	1,96	172,47	1,40	0	1	0
17	0,68	0,65	0,64	0,82	0,81	0,83	1,03	177,67	0,89	0	1	0
18	0,60	0,60	0,60	0,72	0,72	0,73	0,05	117,99	0,22	0	1	0
19	0,62	0,66	0,65	0,76	0,75	0,76	0,37	76,60	1,09	0	1	0
20	0,64	0,67	0,68	0,82	0,80	0,80	0,19	83,22	1,52	0	1	0
21	0,63	0,61	0,64	0,76	0,75	0,77	0,92	68,83	0,05	0	1	0
22	0,68	0,66	0,69	0,79	0,79	0,80	0,64	52,13	0,13	0	1	0
23	0,68	0,65	0,67	0,82	0,80	0,81	0,70	66,89	0,04	0	1	0
24	0,62	0,58	0,60	0,74	0,75	0,72	1,27	138,03	1,51	0	1	0
25	0,67	0,63	0,70	0,87	0,89	0,83	0,09	102,91	3,08	0	1	0
26	0,63	0,61	0,65	0,79	0,79	0,78	0,39	178,85	1,54	0	1	0
27	0,75	0,74	0,73	0,87	0,91	0,89	0,28	51,48	0,92	0	1	0
28	0,58	0,56	0,60	0,70	0,73	0,70	0,11	70,69	1,55	0	1	0
29	0,48	0,47	0,48	0,57	0,61	0,57	0,38	81,74	1,96	0	1	0
30	0,45	0,44	0,45	0,57	0,58	0,56	0,20	115,09	1,05	0	1	0
31	0,48	0,43	0,50	0,61	0,61	0,62	1,57	92,50	1,57	0	1	0
32	0,59	0,54	0,63	0,77	0,79	0,79	1,86	103,79	2,05	0	1	0
33	0,88	0,73	0,94	1,09	1,18	1,16	0,73	20,41	1,42	0	1	0
34	1,26	1,12	1,32	1,57	1,70	1,63	0,49	45,00	2,29	0	1	0
35	1,46	1,31	1,46	1,92	2,05	1,97	0,11	94,90	2,27	0	1	0
36	1,20	1,04	1,22	1,45	1,57	1,56	0,65	32,33	1,55	0	1	0
37	0,71	0,70	0,75	0,94	0,93	0,98	1,22	74,48	0,01	0	1	0
38	0,61	0,58	0,64	0,80	0,78	0,82	3,00	132,07	0,09	0	1	0
39	0,48	0,46	0,51	0,61	0,60	0,60	1,35	81,67	1,20	0	1	0
40	0,49	0,47	0,52	0,63	0,62	0,59	0,50	119,59	6,42	0	1	1
41	0,53	0,51	0,57	0,68	0,69	0,65	0,26	92,29	3,66	0	1	1
42	0,59	0,58	0,64	0,78	0,77	0,76	0,87	196,47	3,33	0	1	0
43	0,81	0,78	0,87	1,05	1,05	1,01	0,60	138,90	4,78	0	1	1
44	0,90	0,87	0,95	1,17	1,16	1,12	0,22	115,88	2,72	0	1	0
45	0,99	0,99	1,05	1,40	1,36	1,29	0,29	133,05	3,04	0	1	0
46	0,79	0,80	0,85	1,17	1,13	1,05	0,55	155,16	4,68	0	1	1
47	0,70	0,70	0,73	0,96	0,90	0,89	1,28	190,13	3,32	0	1	0
48	0,94	0,95	0,96	1,35	1,35	1,22	1,88	157,73	3,13	0	1	0
49	1,00	0,99	1,01	1,44	1,36	1,27	1,29	68,87	1,55	0	1	0
50	0,82	0,85	0,81	1,28	1,18	1,02	3,31	58,51	2,72	0	1	0
51	1,29	1,27	1,18	1,67	2,00	1,51	2,45	19,81	1,36	0	1	0
52	1,51	1,47	1,58	1,99	2,14	1,82	0,20	13,45	0,99	0	1	0
53	1,29	1,33	1,34	1,87	2,15	1,80	0,92	28,65	0,81	0	1	0
54	1,27	1,38	1,34	1,83	2,37	1,79	3,75	37,70	2,37	1	1	0
55	1,08	1,04	1,17	1,65	2,05	1,55	1,30	37,91	3,04	0	1	0
56	1,19	1,12	1,23	1,73	1,93	1,63	0,24	26,26	1,12	0	1	0
57	1,18	1,13	1,31	2,07	2,14	1,68	0,63	44,02	2,85	0	1	0
58	1,47	1,39	1,54	2,21	2,31	1,93	0,44	36,58	1,88	0	1	0
59	1,24	1,15	1,24	1,85	1,91	1,54	1,04	35,26	2,08	0	1	0
60	0,80	0,76	0,87	1,44	1,29	1,18	1,10	61,57	2,41	0	1	0

61	0,91	0,90	0,95	1,24	1,26	1,25	0,05	19,62	0,04	0	1	0
62	0,76	0,71	0,80	1,00	0,96	0,93	1,38	108,75	4,12	0	1	1
63	0,68	0,64	0,72	0,88	0,85	0,84	1,98	102,01	3,07	0	1	0
64	0,62	0,59	0,65	0,80	0,77	0,76	2,01	141,58	2,57	0	1	0
65	0,68	0,64	0,70	0,86	0,82	0,85	3,24	114,72	0,61	0	1	0
66	0,69	0,64	0,72	0,89	0,84	0,88	3,82	104,42	0,57	1	1	0
67	0,73	0,68	0,74	0,94	0,90	0,93	1,70	84,97	0,15	0	1	0
68	0,98	0,92	0,97	1,27	1,24	1,28	0,54	63,71	0,06	0	1	0
69	1,24	1,13	1,34	1,59	1,55	1,58	1,41	33,21	0,81	0	1	0
70	1,54	1,29	1,76	1,87	1,81	1,93	2,96	11,55	0,99	0	1	0
71	2,17	1,75	2,50	2,51	2,44	2,65	2,75	5,50	0,89	0	1	0
72	2,14	1,71	2,37	2,45	2,34	2,59	3,78	8,14	0,82	1	1	0
73	1,87	1,58	2,10	2,19	2,14	2,28	3,20	10,81	1,08	0	1	0
74	1,38	1,29	1,49	1,71	1,67	1,68	1,60	37,33	1,41	0	1	0
75	1,02	0,96	1,07	1,32	1,31	1,29	0,53	67,65	1,08	0	1	0
76	0,85	0,77	0,87	1,13	1,08	1,09	2,74	117,36	0,80	0	1	0
77	0,69	0,63	0,70	0,91	0,87	0,89	2,81	148,21	0,89	0	1	0
78	0,76	0,71	0,80	1,01	0,97	1,01	3,49	143,49	0,85	1	1	0
79	0,73	0,68	0,77	0,95	0,91	0,95	4,10	130,67	0,42	1	1	0
80	0,78	0,71	0,83	1,05	0,99	1,03	5,20	134,85	1,65	1	1	0
81	0,84	0,78	0,89	1,18	1,10	1,14	2,54	104,11	1,15	0	1	0
82	0,79	0,77	0,84	1,05	1,00	1,02	1,60	89,42	1,15	0	1	0
83	0,65	0,63	0,67	0,82	0,79	0,82	1,66	89,64	0,14	0	1	0
84	0,74	0,75	0,80	0,97	0,96	1,00	2,05	94,24	0,20	0	1	0
85	0,84	0,85	0,93	1,06	1,06	1,10	2,92	68,77	0,33	0	1	0
86	0,64	0,61	0,66	0,82	0,81	0,81	1,52	158,16	0,86	0	1	0
87	0,65	0,62	0,65	0,79	0,79	0,79	0,57	120,41	0,57	0	1	0
88	0,70	0,66	0,72	0,87	0,86	0,85	1,23	115,05	1,91	0	1	0
89	0,67	0,62	0,69	0,83	0,82	0,84	3,80	181,69	1,12	1	1	0
90	0,71	0,66	0,70	0,86	0,85	0,87	2,00	142,88	0,46	0	1	0
91	0,69	0,64	0,69	0,83	0,81	0,84	1,95	78,25	0,28	0	1	0
92	0,63	0,60	0,62	0,78	0,72	0,77	2,09	62,58	0,16	0	1	0
93	0,53	0,51	0,51	0,66	0,61	0,63	1,83	65,67	0,41	0	1	0
94	0,44	0,44	0,44	0,54	0,52	0,52	1,07	148,62	0,91	0	1	0
95	0,49	0,49	0,53	0,66	0,61	0,63	2,33	130,22	2,86	0	1	0
96	0,58	0,55	0,62	0,75	0,70	0,72	2,62	64,81	1,35	0	1	0
97	0,89	0,84	0,98	1,15	1,03	1,10	9,04	77,46	3,51	1	1	1
98	1,07	1,01	1,22	1,49	1,28	1,38	16,25	136,75	9,87	1	1	1
99	1,11	1,04	1,18	1,63	1,37	1,49	12,90	182,30	5,82	1	1	1
100	0,83	0,77	0,89	1,24	1,05	1,13	11,51	184,16	4,67	1	1	1
101	0,73	0,70	0,83	1,07	0,93	0,99	5,72	88,17	4,23	1	1	1
102	0,97	0,93	1,08	1,37	1,24	1,33	3,68	73,98	1,35	1	1	0
103	0,91	0,86	1,03	1,29	1,16	1,26	7,08	107,99	2,10	1	1	0
104	0,73	0,68	0,83	1,07	0,93	1,03	8,01	96,83	2,66	1	1	0
105	0,92	0,88	1,03	1,36	1,19	1,31	4,44	80,17	1,82	1	1	0
106	1,09	1,04	1,23	1,60	1,42	1,55	4,70	86,75	1,52	1	1	0

107	1,09	1,02	1,24	1,58	1,41	1,54	7,32	106,31	1,96	1	1	0
108	0,99	0,92	1,11	1,45	1,31	1,40	6,46	137,93	2,14	1	1	0
109	0,87	0,83	0,99	1,27	1,14	1,23	5,68	111,17	2,38	1	1	0
110	0,78	0,72	0,85	1,02	0,95	1,00	5,10	72,18	1,36	1	1	0
111	0,88	0,84	0,90	1,15	1,09	1,14	1,33	68,49	0,10	0	1	0
112	0,85	0,83	0,85	1,11	1,05	1,10	0,61	60,73	0,21	0	1	0
113	0,99	0,99	1,02	1,32	1,23	1,31	1,16	74,41	0,65	0	1	0
114	0,86	0,84	0,87	1,11	1,04	1,10	1,74	101,06	0,35	0	1	0
115	0,63	0,63	0,66	0,83	0,79	0,81	1,90	201,12	2,11	0	1	0
116	0,75	0,73	0,78	1,00	0,93	0,96	2,15	128,85	1,40	0	1	0
117	0,69	0,70	0,71	0,92	0,85	0,87	0,86	86,22	1,29	0	1	0
118	0,61	0,59	0,62	0,76	0,71	0,71	1,90	59,25	1,06	0	1	0
119	0,66	0,63	0,65	0,85	0,80	0,81	1,52	80,67	0,20	0	1	0
120	0,77	0,79	0,79	1,00	0,94	0,96	0,27	38,11	0,72	0	1	0
121	1,12	1,32	1,31	1,60	1,63	1,61	0,72	19,51	0,44	0	1	0
122	1,15	1,30	1,44	1,94	1,96	2,03	0,98	37,00	0,27	0	1	0
123	1,04	1,04	1,19	1,56	1,51	1,58	1,19	57,26	0,41	0	1	0
124	1,13	1,04	1,14	1,44	1,39	1,66	5,85	79,74	2,21	1	1	0
125	0,89	0,84	0,92	1,13	1,04	1,14	4,97	74,98	0,25	1	1	0
126	0,61	0,60	0,65	0,79	0,73	0,78	3,75	80,16	0,85	1	1	0
127	0,56	0,55	0,57	0,74	0,67	0,72	3,08	97,59	1,81	0	1	0
128	0,47	0,48	0,49	0,63	0,58	0,60	0,79	65,97	1,49	0	1	0
129	0,56	0,56	0,60	0,76	0,70	0,74	2,02	79,18	1,03	0	1	0
130	0,71	0,68	0,77	0,96	0,85	0,90	3,73	53,26	2,37	1	1	0
131	0,87	0,90	0,97	1,23	1,09	1,18	2,93	85,02	3,25	0	1	0
132	1,19	1,26	1,42	1,66	1,55	1,74	5,78	61,17	1,42	1	1	0
133	1,36	1,30	1,54	1,79	1,75	1,87	1,48	21,25	0,19	0	1	0
134	1,00	0,96	1,02	1,31	1,21	1,31	2,84	91,61	0,31	0	1	0
135	0,75	0,71	0,75	1,01	0,92	1,00	2,52	74,47	0,32	0	1	0
136	0,71	0,67	0,76	1,01	0,91	0,99	3,31	70,60	0,49	0	1	0
137	0,75	0,72	0,83	1,17	1,04	1,16	4,14	112,11	0,97	1	1	0
138	0,73	0,70	0,77	1,04	0,92	1,02	5,23	133,27	1,41	1	1	0
139	0,69	0,65	0,71	0,94	0,85	0,94	5,98	128,30	0,52	1	1	0
140	0,81	0,73	0,84	1,10	1,00	1,09	4,87	88,41	0,12	1	1	0
141	0,82	0,76	0,82	1,05	0,99	1,04	1,04	36,04	0,01	0	1	0
142	1,04	1,01	1,05	1,31	1,30	1,34	0,21	36,47	0,01	0	1	0
143	1,87	1,87	1,76	1,84	1,98	2,03	0,15	1,18	0,72	0	0	0
144	1,55	1,55	1,51	2,05	1,99	2,06	0,06	55,94	0,23	0	1	0
145	1,27	1,22	1,27	1,76	1,65	1,72	0,94	92,78	0,16	0	1	0
146	1,15	1,10	1,14	1,54	1,41	1,52	1,59	72,44	0,38	0	1	0
147	1,11	1,08	1,15	1,52	1,44	1,52	1,37	94,44	0,16	0	1	0
148	0,97	0,91	1,02	1,33	1,25	1,32	2,42	87,23	0,19	0	1	0
149	0,79	0,74	0,80	1,05	0,99	1,03	1,04	50,10	0,05	0	1	0
150	0,65	0,62	0,69	0,87	0,82	0,85	1,33	49,96	0,36	0	1	0
151	0,81	0,71	0,87	1,15	1,02	1,09	5,38	81,06	1,24	1	1	0
152	0,80	0,75	0,86	1,38	1,13	1,24	3,73	91,19	1,93	1	1	0

153	1,00	0,93	1,04	2,00	1,33	1,59	6,93	64,26	4,96	1	1	1
154	1,11	1,15	1,11	3,38	2,19	2,82	3,15	79,83	3,56	0	1	1
155	2,32	1,95	1,78	4,47	3,41	4,01	1,90	39,87	0,63	0	1	0

# Приложение №7

**Таблица 7.1. Стабильность солевых мостиков в модели NIP7-ABY**

Температура (К)	300			373			Общее	Низкая темп	Высокая темп	$S^t$	Низкое давление	Высокое давление	$S^p$
	Давление (МПа)	0,1	50	100	0,1	50							
10;4	100,00%	100,00%	100,00%	88,96%	93,63%	100,00%	97,10%	100,00%	94,20%	1,06	94,48%	98,41%	0,96
75;37	78,31%	91,94%	97,91%	92,84%	94,73%	95,52%	91,87%	89,39%	94,36%	0,95	85,57%	95,02%	0,90
37;10	80,30%	84,58%	82,19%	72,74%	87,26%	96,32%	83,90%	82,35%	85,44%	0,96	76,52%	87,59%	0,87
148;109	75,42%	79,20%	88,96%	74,03%	80,20%	76,32%	79,02%	81,19%	76,85%	1,06	74,73%	81,17%	0,92
33;4	83,58%	79,10%	72,34%	73,63%	78,01%	65,67%	75,39%	78,34%	72,44%	1,08	78,61%	73,78%	1,07
20;17	76,62%	78,81%	78,81%	71,04%	73,63%	70,55%	74,91%	78,08%	71,74%	1,09	73,83%	75,45%	0,98
16;12	78,11%	61,29%	55,72%	69,15%	80,60%	71,84%	69,45%	65,04%	73,86%	0,88	73,63%	67,36%	1,09
147;113	81,39%	59,70%	40,10%	65,47%	53,03%	59,30%	59,83%	60,40%	59,27%	1,02	73,43%	53,03%	1,38
33;2	52,04%	77,11%	46,57%	65,17%	58,51%	49,35%	58,13%	58,57%	57,68%	1,02	58,61%	57,89%	1,01
131;116	40,60%	46,27%	27,66%	76,22%	74,53%	70,05%	55,89%	38,18%	73,60%	0,52	58,41%	54,63%	1,07
51;5	47,86%	40,50%	45,27%	50,25%	58,51%	58,21%	50,10%	44,54%	55,66%	0,80	49,05%	50,62%	0,97
76;70	43,08%	30,15%	37,41%	47,96%	42,49%	42,49%	40,60%	36,88%	44,31%	0,83	45,52%	38,13%	1,19
147;146	28,36%	24,98%	22,89%	46,47%	39,90%	53,93%	36,09%	25,41%	46,77%	0,54	37,41%	35,42%	1,06
48;45	37,91%	43,08%	22,89%	37,31%	36,22%	36,22%	35,61%	34,63%	36,58%	0,95	37,61%	34,60%	1,09
88;23	30,95%	26,37%	20,20%	33,03%	32,74%	31,54%	29,14%	25,84%	32,44%	0,80	31,99%	27,71%	1,15
151;109	33,43%	21,89%	23,88%	28,06%	16,12%	29,85%	25,54%	26,40%	24,68%	1,07	30,75%	22,94%	1,34
119;117	18,11%	29,85%	27,56%	24,28%	22,89%	26,87%	24,93%	25,17%	24,68%	1,02	21,19%	26,79%	0,79
48;44	26,47%	24,08%	21,09%	21,69%	23,48%	25,87%	23,78%	23,88%	23,68%	1,01	24,08%	23,63%	1,02
51;2	25,97%	17,41%	36,12%	5,97%	11,34%	15,02%	18,64%	26,50%	10,78%	2,46	15,97%	19,98%	0,80
90;88	11,84%	11,24%	6,07%	26,17%	28,36%	25,77%	18,24%	9,72%	26,77%	0,36	19,00%	17,86%	1,06
19;16	11,54%	25,17%	30,35%	16,02%	8,56%	13,23%	17,48%	22,35%	12,60%	1,77	13,78%	19,33%	0,71
155;125	37,41%	14,83%	9,75%	6,67%	10,75%	13,63%	15,51%	20,66%	10,35%	2,00	22,04%	12,24%	1,80
68;38	14,43%	0	0,20%	14,03%	38,41%	15,02%	13,68%	4,88%	22,49%	0,22	14,23%	13,41%	1,06
91;90	13,53%	13,33%	7,56%	14,83%	12,84%	14,33%	12,74%	11,48%	14,00%	0,82	14,18%	12,01%	1,18
76;17	7,76%	18,41%	9,35%	9,65%	13,73%	12,74%	11,94%	11,84%	12,04%	0,98	8,71%	13,56%	0,64
117;116	1,39%	4,48%	0,20%	22,09%	18,91%	24,18%	11,87%	2,02%	21,72%	0,09	11,74%	11,94%	0,98
146;112	4,28%	20,80%	14,23%	8,76%	10,15%	9,65%	11,31%	13,10%	9,52%	1,38	6,52%	13,71%	0,48
125;17	1,29%	0,40%	9,55%	19,30%	19,50%	16,42%	11,08%	3,75%	18,41%	0,20	10,30%	11,47%	0,90
155;151	0,40%	9,25%	0,20%	16,62%	33,23%	2,59%	10,38%	3,28%	17,48%	0,19	8,51%	11,32%	0,75
119;90	13,13%	5,97%	14,33%	8,46%	5,37%	5,97%	8,87%	11,14%	6,60%	1,69	10,80%	7,91%	1,36

155;154	1,19%	0,30%	1,89%	9,85%	9,95%	8,66%	5,31%	1,13%	9,49%	0,12	5,52%	5,20%	1,06
20;19	5,37%	1,29%	5,27%	7,06%	7,26%	5,17%	5,24%	3,98%	6,50%	0,61	6,22%	4,75%	1,31
113;99	0	6,27%	8,46%	4,98%	4,48%	4,48%	4,78%	4,91%	4,64%	1,06	2,49%	5,92%	0,42
52;5	3,58%	0,20%	0	0,80%	22,79%	0	4,56%	1,26%	7,86%	0,16	2,19%	5,75%	0,38
71;68	22,79%	0,20%	1,09%	0,80%	0,60%	0,50%	4,33%	8,03%	0,63%	12,74	11,79%	0,60%	19,75
91;19	2,79%	3,98%	0,20%	6,57%	5,57%	5,87%	4,16%	2,32%	6,00%	0,39	4,68%	3,91%	1,20
155;68	0,10%	1,00%	5,47%	3,28%	3,68%	6,97%	3,42%	2,19%	4,64%	0,47	1,69%	4,28%	0,40
51;4	0,00%	0,00%	0,00%	15,32%	1,09%	0,00%	2,74%	0,00%	5,47%	0,00	7,66%	0,27%	28,00
155;148	0	0	0	6,07%	8,86%	0,60%	2,59%	0,00%	5,17%	0,00	3,03%	2,36%	1,28
37;33	0,90%	3,98%	0	4,18%	4,58%	1,79%	2,57%	1,63%	3,52%	0,46	2,54%	2,59%	0,98
52;2	0	0	0	8,66%	0,30%	0,50%	1,58%	0,00%	3,15%	0,00	4,33%	0,20%	21,75
124;71	0,10%	0,70%	0,10%	0,60%	5,57%	1,39%	1,41%	0,30%	2,52%	0,12	0,35%	1,94%	0,18
155;124	0,20%	0	0,10%	0,30%	3,68%	2,79%	1,18%	0,10%	2,26%	0,04	0,25%	1,64%	0,15
70;68	1,39%	0,10%	0,30%	2,59%	1,39%	0,90%	1,11%	0,60%	1,63%	0,37	1,99%	0,67%	2,96
56;38	0	0	0	1,69%	4,88%	0	1,09%	0,00%	2,19%	0,00	0,85%	1,22%	0,69
51;48	0	1,39%	1,29%	0,70%	1,89%	0,20%	0,91%	0,90%	0,93%	0,96	0,35%	1,19%	0,29
155;76	0,10%	0	0	2,09%	0,80%	1,39%	0,73%	0,03%	1,43%	0,02	1,09%	0,55%	2,00
113;112	1,79%	0	0	0,80%	0	1,09%	0,61%	0,60%	0,63%	0,95	1,29%	0,27%	4,73
27;26	0,50%	0,20%	0,30%	0,20%	1,09%	1,29%	0,60%	0,33%	0,86%	0,38	0,35%	0,72%	0,48
155;144	0	0	0	0,40%	1,39%	0,10%	0,32%	0,00%	0,63%	0,00	0,20%	0,37%	0,53
75;35	0	0	0	0,50%	1,29%	0	0,30%	0,00%	0,60%	0,00	0,25%	0,32%	0,77
154;109	0	0	0	1,09%	0,70%	0,00%	0,30%	0,00%	0,60%	0,00	0,55%	0,17%	3,14
155;108	0	0	0,20%	1,09%	0,10%	0	0,23%	0,07%	0,40%	0,17	0,55%	0,07%	7,33
124;70	0,10%	0,50%	0		0,60%	0,10%	0,22%	0,20%	0,35%	0,57	0,10%	0,30%	0,33
109;108	0,10%	0	0	0,50%	0,20%	0	0,13%	0,03%	0,23%	0,14	0,30%	0,05%	6,00
125;71	0	0	0	0,20%	0,30%	0	0,08%	0,00%	0,17%	0,00	0,10%	0,07%	1,33
76;71	0	0	0	0,20%	0,10%	0,20%	0,08%	0,00%	0,17%	0,00	0,10%	0,07%	1,33
52;48	0	0	0	0,10%	0,20%	0	0,05%	0,00%	0,10%	0,00	0,05%	0,05%	1,00
44;26	0	0	0	0,20%	0	0	0,03%	0,00%	0,07%	0,00	0,10%	0,00%	0
91;23	0	0	0	0,10%	0	0	0,02%	0,00%	0,03%	0,00	0,05%	0,00%	0,00

Таблица 7.2. Стабильность солевых мостиков в модели NIP7-FUR

Температура (К)	300К			373К			Общее	Низкая темп	Высокая темп	$S^t$	Низкое давление	Высокое давление	$S^p$
	0,1	50	100	0,1	50	100							
10;4	100,00%	100,00%	100,00%	97,41%	100,00%	100,00%	99,57%	100,00%	99,14%	1,01	98,71%	100,00%	0,99
75;37	98,71%	96,82%	98,01%	95,62%	97,11%	97,51%	97,30%	97,84%	96,75%	1,01	97,16%	97,36%	1,00
131;116	89,35%	93,33%	90,35%	92,54%	88,06%	87,56%	90,20%	91,01%	89,39%	1,02	90,95%	89,83%	1,01
33;4	87,96%	87,06%	89,75%	86,87%	84,18%	89,15%	87,50%	88,26%	86,73%	1,02	87,41%	87,54%	1,00
37;10	87,56%	45,17%	90,25%	87,96%	82,99%	92,04%	81,00%	74,33%	87,66%	0,85	87,76%	77,61%	1,13
20;17	80,60%	84,48%	78,51%	75,02%	62,39%	78,61%	76,60%	81,19%	72,01%	1,13	77,81%	76,00%	1,02
16;12	82,69%	75,92%	61,09%	81,19%	79,50%	76,62%	76,17%	73,23%	79,10%	0,93	81,94%	73,28%	1,12
51;5	66,47%	66,47%	62,79%	42,69%	62,99%	65,77%	61,19%	65,24%	57,15%	1,14	54,58%	64,50%	0,85
151;109	66,77%	58,41%	55,92%	51,64%	52,54%	50,85%	56,02%	60,36%	51,67%	1,17	59,20%	54,43%	1,09
76;70	38,21%	43,08%	26,47%	46,17%	45,67%	45,87%	40,91%	35,92%	45,90%	0,78	42,19%	40,27%	1,05
48;45	38,31%	45,17%	23,28%	38,41%	36,92%	30,35%	35,41%	35,59%	35,22%	1,01	38,36%	33,93%	1,13
146;112	26,67%	33,23%	30,55%	29,65%	29,15%	32,24%	30,25%	30,15%	30,35%	0,99	28,16%	31,29%	0,90
76;17	20,80%	16,92%	25,77%	19,10%	16,62%	16,72%	19,32%	21,16%	17,48%	1,21	19,95%	19,00%	1,05
148;109	10,35%	10,85%	7,56%	34,53%	26,47%	24,08%	18,97%	9,59%	28,36%	0,34	22,44%	17,24%	1,30
155;140	0	0,60%	1,29%	36,02%	13,43%	21,49%	12,14%	0,63%	23,65%	0,03	18,01%	9,20%	1,96
91;90	6,37%	8,76%	7,36%	14,73%	12,94%	11,44%	10,27%	7,50%	13,03%	0,58	10,55%	10,12%	1,04
155;151	0	16,82%	0,00%	15,32%	12,64%	7,96%	8,79%	5,61%	11,97%	0,47	7,66%	9,35%	0,82
19;16	6,37%	11,74%	12,04%	6,67%	6,87%	5,87%	8,26%	10,05%	6,47%	1,55	6,52%	9,13%	0,71
147;113	8,36%	7,86%	3,68%	7,16%	7,66%	11,14%	7,65%	6,63%	8,66%	0,77	7,76%	7,59%	1,02
51;48	10,35%	0,10%	9,15%	17,61%	2,99%	1,79%	7,00%	6,53%	7,46%	0,88	13,98%	3,51%	3,99
91;19	5,67%	7,16%	4,38%	9,25%	8,36%	6,17%	6,83%	5,74%	7,93%	0,72	7,46%	6,52%	1,15
52;5	0	0,00%	0,00%	25,17%	10,25%	2,89%	6,38%	0,00%	12,77%	0,00	12,59%	3,28%	3,83
125;17	1,89%	0,20%	1,59%	6,37%	17,11%	8,16%	5,89%	1,23%	10,55%	0,12	4,13%	6,77%	0,61
20;19	7,26%	2,39%	6,27%	6,57%	7,76%	4,88%	5,85%	5,31%	6,40%	0,83	6,92%	5,32%	1,30
148;147	4,88%	3,38%	6,27%	6,07%	6,67%	6,27%	5,59%	4,84%	6,33%	0,76	5,47%	5,65%	0,97
155;125	0,60%	0,50%	0,00%	4,68%	5,47%	15,22%	4,41%	0,36%	8,46%	0,04	2,64%	5,30%	0,50
52;48	0,50%	0,00%	2,99%	0,80%	1,19%	20,10%	4,26%	1,16%	7,36%	0,16	0,65%	6,07%	0,11
37;33	0	0,20%	9,05%	3,38%	2,49%	3,28%	3,07%	3,08%	3,05%	1,01	1,69%	3,76%	0,45

56;38	0	0,00%	0,00%	17,31%	0,20%	0,00%	2,92%	0,00%	5,84%	0,00	8,66%	0,05%	174,00
155;124	0	0,00%	0,00%	3,88%	0,90%	7,86%	2,11%	0,00%	4,21%	0,00	1,94%	2,19%	0,89
146;113	0,60%	1,69%	1,49%	3,48%	2,59%	1,49%	1,89%	1,26%	2,52%	0,50	2,04%	1,82%	1,12
155;76	0	0,00%	0,00%	0,00%	3,08%	3,08%	1,03%	0,00%	2,06%	0,00	0,00%	1,54%	0,00
56;51	0	0,00%	0,00%	0,00%	4,88%	0,00%	0,81%	0,00%	1,63%	0,00	0,00%	1,22%	0,00
155;68	0	0,10%	0,00%	0,50%	0,30%	3,18%	0,68%	0,03%	1,33%	0,03	0,25%	0,90%	0,28
71;68	0,00%	0,20%	0,00%	1,00%	0,30%	1,39%	0,48%	0,07%	0,90%	0,07	0,50%	0,47%	1,05
109;108	0	0,00%	0,50%	0,70%	0,70%	0,80%	0,45%	0,17%	0,73%	0,23	0,35%	0,50%	0,70
70;68	0,10%	0,00%	0,00%	0,40%	0,20%	1,00%	0,28%	0,03%	0,53%	0,06	0,25%	0,30%	0,83
76;71	0,00%	0,00%	0,00%	0,10%	0,00%	1,29%	0,23%	0,00%	0,46%	0,00	0,05%	0,32%	0,15
140;109	0	0,10%	0,20%	0,10%	0,40%	0,00%	0,13%	0,10%	0,17%	0,60	0,05%	0,17%	0,29
75;35	0,00%	0,00%	0,00%	0,30%	0,40%	0,00%	0,12%	0,00%	0,23%	0,00	0,15%	0,10%	1,50
124;71	0,10%	0,00%	0,00%	0,20%	0,20%	0,20%	0,12%	0,03%	0,20%	0,17	0,15%	0,10%	1,50
140;71	0	0	0	0,20%	0,30%	0,10%	0,10%	0,00%	0,20%	0,00	0,10%	0,10%	1,00
131;117	0,00%	0,00%	0,00%	0,10%	0,30%	0,10%	0,08%	0,00%	0,17%	0,00	0,05%	0,10%	0,50
125;71	0,00%	0,00%	0,00%	0,20%	0,30%	0,00%	0,08%	0,00%	0,17%	0,00	0,10%	0,07%	1,33
125;70	0,00%	0,00%	0,00%	0,10%	0,30%	0,00%	0,07%	0,00%	0,13%	0,00	0,05%	0,07%	0,67
38;35	0	0	0,00%	0,30%	0	0	0,05%	0,00%	0,10%	0,00	0,15%	0,00%	0,00
155;148	0	0,00%	0,00%	0,10%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,03%	0,00	0,05%	0,00%	0,00
68;38	0,00%	0,00%	0,00%	0,10%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,03%	0,00	0,05%	0,00%	0,00

**Таблица 7.3** Солевые мостики в кристаллографической структуре белка Nip7 *P.abysssi*

Атом 1	Атом 2	Длина мостика (А)
GLU-10:OE1	ARG-4:NH1	2,65377524
GLU-10:OE1	ARG-4:NH2	3,4833049
GLU-10:OE2	ARG-4:NH1	3,417793
GLU-10:OE2	ARG-4:NH2	2,58558871
LYS-20:NZ	GLU-17:OE1	2,74728466
LYS-20:NZ	GLU-17:OE2	3,97384461
GLU-33:OE2	ARG-2:NH1	3,84601586
GLU-33:OE2	ARG-4:NH2	3,24681582
ARG-37:NH1	GLU-10:OE2	3,04997934
LYS-48:NZ	GLU-44:OE2	3,52685993
GLU-75:OE1	ARG-37:NH2	3,36239453
ASP-146:OD1	LYS-112:NZ	3,83243252



22	0,64	0,64	0,61	0,80	0,81	0,77	0,68	0,66	0,69	0,79	0,79	0,80	0,19	126,75	3,81	0,12	2,08	2,78	0,02	0	1	0	0	0	0	0
23	0,73	0,70	0,64	0,86	0,87	0,82	0,68	0,65	0,67	0,82	0,80	0,81	2,18	122,04	7,03	0,28	2,45	0,30	0,27	0	1	1	0	0	0	0
24	0,66	0,60	0,56	0,81	0,81	0,79	0,62	0,58	0,60	0,74	0,75	0,72	3,81	181,65	8,60	1,44	1,04	5,50	0,86	1	1	1	0	0	1	0
25	0,79	0,89	0,63	1,05	1,12	1,09	0,67	0,63	0,70	0,87	0,89	0,83	0,87	33,28	13,47	0,19	1,05	1,82	1,35	0	1	1	0	0	0	0
26	0,67	0,71	0,60	0,86	0,86	0,82	0,63	0,61	0,65	0,79	0,79	0,78	1,17	77,19	5,49	0,06	2,05	0,62	0,75	0	1	1	0	0	0	0
27	0,74	0,73	0,59	0,93	0,92	0,89	0,75	0,74	0,73	0,87	0,91	0,89	2,64	89,05	0,42	1,16	1,84	4,20	0,82	0	1	0	0	0	0	1
28	0,59	0,59	0,52	0,76	0,72	0,71	0,58	0,56	0,60	0,70	0,73	0,70	1,26	100,37	0,08	0,02	2,01	1,40	1,50	0	1	0	0	0	0	0
29	0,48	0,46	0,41	0,62	0,59	0,55	0,48	0,47	0,48	0,57	0,61	0,57	5,27	182,44	1,50	0,68	4,15	3,53	0,95	1	1	0	0	1	0	0
30	0,46	0,46	0,43	0,62	0,60	0,56	0,45	0,44	0,45	0,57	0,58	0,56	2,45	155,02	1,76	0,73	1,34	1,10	0,27	0	1	0	0	0	0	0
31	0,50	0,47	0,51	0,63	0,63	0,57	0,48	0,43	0,50	0,61	0,61	0,62	0,50	109,84	0,51	3,46	1,45	1,35	0,54	0	1	0	1	0	0	0
32	0,68	0,63	0,63	0,79	0,81	0,77	0,59	0,54	0,63	0,77	0,79	0,79	0,28	101,36	3,02	1,96	1,60	1,97	0,20	0	1	0	0	0	0	0
33	0,96	0,92	0,89	1,16	1,16	1,09	0,88	0,73	0,94	1,09	1,18	1,16	0,15	36,68	0,62	1,13	1,19	0,86	0,61	0	1	0	0	0	0	0
34	1,36	1,45	1,39	1,68	1,68	1,58	1,26	1,12	1,32	1,57	1,70	1,63	0,10	63,16	4,87	1,27	1,08	3,70	1,68	0	1	1	0	0	0	0
35	1,52	1,69	1,59	1,98	2,02	1,87	1,46	1,31	1,46	1,92	2,05	1,97	0,48	101,99	3,52	0,77	1,05	5,78	1,76	0	1	0	0	0	1	0
36	1,26	1,27	1,31	1,41	1,54	1,30	1,20	1,04	1,22	1,45	1,57	1,56	0,10	26,43	0,03	2,23	1,20	5,60	0,50	0	1	0	0	0	1	0
37	0,80	0,75	0,76	0,97	1,01	0,86	0,71	0,70	0,75	0,94	0,93	0,98	0,12	49,60	0,76	0,59	1,73	0,85	0,52	0	1	0	0	0	0	0
38	0,65	0,62	0,63	0,80	0,83	0,74	0,61	0,58	0,64	0,80	0,78	0,82	0,17	93,39	0,14	0,90	2,04	1,25	0,44	0	1	0	0	0	0	0
39	0,49	0,47	0,49	0,62	0,62	0,57	0,48	0,46	0,51	0,61	0,60	0,60	0,57	123,86	0,02	2,70	1,40	0,01	0,10	0	1	0	0	0	0	0
40	0,50	0,49	0,47	0,60	0,63	0,59	0,49	0,47	0,52	0,63	0,62	0,59	0,55	159,84	0,73	2,61	1,45	0,00	2,53	0	1	0	0	0	0	0
41	0,56	0,56	0,50	0,67	0,67	0,65	0,53	0,51	0,57	0,68	0,69	0,65	0,71	121,71	0,22	0,39	1,59	0,30	2,96	0	1	0	0	0	0	0
42	0,61	0,64	0,57	0,77	0,75	0,75	0,59	0,58	0,64	0,78	0,77	0,76	0,30	141,61	0,23	0,36	1,77	0,44	1,89	0	1	0	0	0	0	0
43	0,81	0,82	0,77	1,05	1,02	1,02	0,81	0,78	0,87	1,05	1,05	1,01	0,16	132,87	0,50	0,58	0,78	0,11	1,92	0	1	0	0	0	0	0
44	0,94	0,95	0,89	1,22	1,17	1,17	0,90	0,87	0,95	1,17	1,16	1,12	0,50	149,20	1,94	0,49	0,54	0,15	1,79	0	1	0	0	0	0	0
45	1,05	1,14	1,02	1,41	1,32	1,36	0,99	0,99	1,05	1,40	1,36	1,29	0,47	167,74	2,29	1,98	0,30	0,87	2,95	0	1	0	0	0	0	0
46	0,78	0,84	0,76	1,12	1,07	1,07	0,79	0,80	0,85	1,17	1,13	1,05	0,97	216,00	1,46	2,20	0,14	0,16	2,43	0	1	0	0	0	0	0
47	0,68	0,73	0,68	0,95	0,88	0,88	0,70	0,70	0,73	0,96	0,90	0,89	1,31	217,60	0,90	3,91	0,57	0,00	0,71	0	1	0	1	0	0	0
48	0,92	1,02	0,91	1,34	1,23	1,22	0,94	0,95	0,96	1,35	1,35	1,22	2,76	180,23	0,77	2,73	0,02	0,56	1,99	0	1	0	0	0	0	0
49	0,94	1,04	0,97	1,36	1,28	1,22	1,00	0,99	1,01	1,44	1,36	1,27	1,77	110,72	2,05	2,81	0,29	0,75	0,38	0	1	0	0	0	0	0

50	0,77	0,83	0,76	1,21	1,12	1,03	0,82	0,85	0,81	1,28	1,18	1,02	4,93	115,37	1,75	4,19	0,12	0,00	0,16	1	1	0	1	0	0	0
51	1,13	1,37	1,09	1,80	1,57	1,50	1,29	1,27	1,18	1,67	2,00	1,51	4,31	46,90	1,38	0,47	0,46	0,14	3,34	1	1	0	0	0	0	1
52	1,24	1,33	1,29	2,22	1,82	1,63	1,51	1,47	1,58	1,99	2,14	1,82	1,17	38,16	3,63	2,20	0,70	0,65	1,30	0	1	0	0	0	0	0
53	1,22	1,24	1,11	2,06	1,84	1,58	1,29	1,33	1,34	1,87	2,15	1,80	2,31	70,09	2,74	1,23	1,44	0,02	0,84	0	1	0	0	0	0	0
54	1,37	1,44	1,13	2,42	2,11	1,70	1,27	1,38	1,34	1,83	2,37	1,79	5,72	75,98	0,15	1,61	3,67	0,34	2,03	1	1	0	0	1	0	0
55	1,18	1,22	0,98	2,12	1,89	1,48	1,08	1,04	1,17	1,65	2,05	1,55	4,29	79,88	0,54	2,60	2,62	0,12	1,81	1	1	0	0	0	0	0
56	1,23	1,29	1,05	1,92	1,91	1,56	1,19	1,12	1,23	1,73	1,93	1,63	2,15	54,73	0,08	0,88	0,89	0,03	0,45	0	1	0	0	0	0	0
57	1,28	1,36	1,07	2,32	1,94	1,76	1,18	1,13	1,31	2,07	2,14	1,68	2,26	55,32	0,13	1,52	0,56	0,00	1,16	0	1	0	0	0	0	0
58	1,61	1,61	1,37	2,44	2,00	2,01	1,47	1,39	1,54	2,21	2,31	1,93	1,95	51,82	0,12	0,74	0,70	0,10	1,72	0	1	0	0	0	0	0
59	1,42	1,32	1,18	1,77	2,03	1,63	1,24	1,15	1,24	1,85	1,91	1,54	2,66	47,21	0,85	1,90	0,27	0,12	0,56	0	1	0	0	0	0	0
60	0,91	0,84	0,78	1,46	1,34	1,26	0,80	0,76	0,87	1,44	1,29	1,18	3,02	119,43	0,88	1,56	0,32	0,03	0,78	0	1	0	0	0	0	0
61	0,99	0,96	0,91	1,35	1,28	1,42	0,91	0,90	0,95	1,24	1,26	1,25	0,11	45,48	1,44	0,16	0,10	0,43	0,42	0	1	0	0	0	0	0
62	0,82	0,83	0,73	1,01	0,99	0,95	0,76	0,71	0,80	1,00	0,96	0,93	1,89	121,00	2,47	0,44	2,60	0,15	2,51	0	1	0	0	0	0	0
63	0,70	0,70	0,66	0,87	0,87	0,83	0,68	0,64	0,72	0,88	0,85	0,84	0,61	132,02	0,17	1,17	2,42	0,05	0,90	0	1	0	0	0	0	0
64	0,61	0,62	0,60	0,78	0,77	0,73	0,62	0,59	0,65	0,80	0,77	0,76	0,70	169,22	0,80	1,93	2,21	0,10	0,29	0	1	0	0	0	0	0
65	0,63	0,63	0,65	0,81	0,80	0,76	0,68	0,64	0,70	0,86	0,82	0,85	0,71	121,85	9,20	1,27	1,55	0,27	0,11	0	1	1	0	0	0	0
66	0,64	0,64	0,65	0,85	0,85	0,78	0,69	0,64	0,72	0,89	0,84	0,88	0,94	138,86	6,46	1,56	2,44	0,07	0,13	0	1	1	0	0	0	0
67	0,68	0,68	0,69	0,91	0,89	0,83	0,73	0,68	0,74	0,94	0,90	0,93	0,66	138,12	4,93	0,89	1,49	0,26	0,34	0	1	1	0	0	0	0
68	0,91	0,92	0,91	1,24	1,24	1,14	0,98	0,92	0,97	1,27	1,24	1,28	0,30	116,40	2,99	0,39	1,02	0,05	0,38	0	1	0	0	0	0	0
69	1,16	1,12	1,08	1,61	1,60	1,49	1,24	1,13	1,34	1,59	1,55	1,58	0,58	108,03	2,74	0,93	2,36	2,19	0,18	0	1	0	0	0	0	0
70	1,39	1,33	1,25	2,06	1,88	1,83	1,54	1,29	1,76	1,87	1,81	1,93	1,99	58,46	1,61	0,61	3,57	4,45	0,87	0	1	0	0	1	1	0
71	1,97	1,82	1,68	2,78	2,56	2,54	2,17	1,75	2,50	2,51	2,44	2,65	1,99	38,03	1,35	0,41	3,42	4,49	0,98	0	1	0	0	1	1	0
72	2,12	1,83	1,69	2,61	2,41	2,41	2,14	1,71	2,37	2,45	2,34	2,59	3,22	31,72	1,01	0,47	3,79	1,47	0,83	1	1	0	0	1	0	0
73	1,76	1,67	1,54	2,34	2,19	2,13	1,87	1,58	2,10	2,19	2,14	2,28	1,81	48,69	1,80	0,48	4,08	2,76	0,97	0	1	0	0	1	0	0
74	1,32	1,32	1,26	1,77	1,69	1,61	1,38	1,29	1,49	1,71	1,67	1,68	0,65	85,55	1,17	1,07	2,08	1,51	0,51	0	1	0	0	0	0	0
75	0,99	0,99	0,95	1,36	1,31	1,24	1,02	0,96	1,07	1,32	1,31	1,29	0,72	120,09	0,64	0,90	1,18	0,49	0,29	0	1	0	0	0	0	0
76	0,84	0,86	0,79	1,17	1,07	1,06	0,85	0,77	0,87	1,13	1,08	1,09	2,52	154,36	0,03	0,62	1,69	0,00	1,17	0	1	0	0	0	0	0
77	0,67	0,68	0,64	0,92	0,85	0,83	0,69	0,63	0,70	0,91	0,87	0,89	2,28	169,26	0,75	0,79	1,74	0,23	0,77	0	1	0	0	0	0	0

78	0,72	0,72	0,72	0,99	0,94	0,90	0,76	0,71	0,80	1,01	0,97	1,01	1,37	172,96	6,23	1,29	2,23	0,26	0,30	0	1	1	0	0	0	0
79	0,68	0,67	0,67	0,89	0,87	0,82	0,73	0,68	0,77	0,95	0,91	0,95	1,33	153,05	16,76	0,88	2,07	0,54	0,06	0	1	1	0	0	0	0
80	0,74	0,74	0,75	0,97	0,95	0,91	0,78	0,71	0,83	1,05	0,99	1,03	1,86	152,20	9,08	1,85	2,15	1,91	0,09	0	1	1	0	0	0	0
81	0,75	0,73	0,79	1,03	0,99	0,94	0,84	0,78	0,89	1,18	1,10	1,14	1,68	139,19	26,84	2,46	0,83	2,94	0,02	0	1	1	0	0	0	0
82	0,72	0,73	0,73	0,94	0,93	0,89	0,79	0,77	0,84	1,05	1,00	1,02	0,35	122,74	22,10	1,58	1,17	0,64	0,01	0	1	1	0	0	0	0
83	0,61	0,62	0,60	0,77	0,79	0,74	0,65	0,63	0,67	0,82	0,79	0,82	0,03	126,05	9,06	0,23	2,00	0,01	0,02	0	1	1	0	0	0	0
84	0,70	0,68	0,69	0,89	0,91	0,85	0,74	0,75	0,80	0,97	0,96	1,00	0,11	105,77	17,05	0,40	1,63	0,29	0,25	0	1	1	0	0	0	0
85	0,80	0,77	0,79	1,00	1,02	0,97	0,84	0,85	0,93	1,06	1,06	1,10	0,53	95,50	15,44	0,49	1,56	0,05	0,25	0	1	1	0	0	0	0
86	0,66	0,64	0,62	0,83	0,85	0,79	0,64	0,61	0,66	0,82	0,81	0,81	0,52	143,70	0,10	0,72	1,49	0,09	0,11	0	1	0	0	0	0	0
87	0,64	0,61	0,59	0,80	0,83	0,78	0,65	0,62	0,65	0,79	0,79	0,79	0,49	141,75	0,31	0,78	0,85	2,18	0,17	0	1	0	0	0	0	0
88	0,69	0,67	0,65	0,85	0,86	0,85	0,70	0,66	0,72	0,87	0,86	0,85	0,34	131,74	0,76	0,49	0,84	0,40	0,84	0	1	0	0	0	0	0
89	0,61	0,63	0,63	0,79	0,79	0,78	0,67	0,62	0,69	0,83	0,82	0,84	0,55	141,11	7,68	0,48	1,11	0,07	0,26	0	1	1	0	0	0	0
90	0,67	0,71	0,69	0,85	0,83	0,82	0,71	0,66	0,70	0,86	0,85	0,87	0,12	106,47	1,01	0,11	0,95	0,64	0,80	0	1	0	0	0	0	0
91	0,61	0,66	0,68	0,77	0,75	0,75	0,69	0,64	0,69	0,83	0,81	0,84	0,64	52,13	6,59	0,44	0,56	2,05	0,71	0	1	1	0	0	0	0
92	0,54	0,59	0,59	0,68	0,65	0,65	0,63	0,60	0,62	0,78	0,72	0,77	0,58	57,19	21,56	0,86	1,02	3,27	0,60	0	1	1	0	0	0	0
93	0,45	0,50	0,48	0,57	0,54	0,53	0,53	0,51	0,51	0,66	0,61	0,63	0,57	82,31	37,70	2,07	1,48	4,48	0,56	0	1	1	0	0	1	0
94	0,42	0,42	0,40	0,52	0,49	0,49	0,44	0,44	0,44	0,54	0,52	0,52	2,55	175,14	15,97	1,11	0,79	0,11	0,15	0	1	1	0	0	0	0
95	0,55	0,54	0,48	0,66	0,61	0,62	0,49	0,49	0,53	0,66	0,61	0,63	2,67	137,13	0,54	1,54	2,60	1,71	2,38	0	1	0	0	0	0	0
96	0,59	0,57	0,54	0,71	0,68	0,66	0,58	0,55	0,62	0,75	0,70	0,72	2,12	95,62	4,72	0,57	2,88	1,39	0,73	0	1	1	0	0	0	0
97	0,85	0,86	0,78	1,07	1,00	0,99	0,89	0,84	0,98	1,15	1,03	1,10	3,39	114,11	15,11	1,68	5,88	0,01	1,69	1	1	1	0	1	0	0
98	1,08	1,17	1,04	1,55	1,51	1,50	1,07	1,01	1,22	1,49	1,28	1,38	2,01	220,62	7,69	3,75	7,98	8,62	2,83	0	1	1	1	1	1	0
99	1,16	1,30	1,23	1,80	1,76	1,77	1,11	1,04	1,18	1,63	1,37	1,49	1,82	276,78	51,11	4,24	5,25	8,78	0,48	0	1	1	1	1	1	0
100	0,78	0,86	0,78	1,29	1,24	1,24	0,83	0,77	0,89	1,24	1,05	1,13	1,79	242,99	3,99	2,57	3,55	8,86	0,65	0	1	0	0	1	1	0
101	0,78	0,79	0,76	1,11	1,03	1,02	0,73	0,70	0,83	1,07	0,93	0,99	2,96	158,80	4,35	3,49	2,59	0,68	0,84	0	1	1	1	0	0	0
102	1,05	1,05	1,03	1,44	1,34	1,34	0,97	0,93	1,08	1,37	1,24	1,33	2,10	123,78	3,77	1,41	1,61	0,04	0,15	0	1	0	0	0	0	0
103	0,94	0,98	0,97	1,40	1,33	1,34	0,91	0,86	1,03	1,29	1,16	1,26	2,46	176,53	7,99	1,86	2,12	2,66	0,29	0	1	1	0	0	0	0
104	0,79	0,77	0,77	1,12	1,06	1,07	0,73	0,68	0,83	1,07	0,93	1,03	4,51	186,71	6,48	1,91	2,91	1,00	0,61	1	1	1	0	0	0	0
105	1,09	1,04	1,02	1,47	1,35	1,33	0,92	0,88	1,03	1,36	1,19	1,31	3,71	140,93	13,03	1,66	2,89	0,05	0,31	1	1	1	0	0	0	0

106	1,23	1,20	1,18	1,69	1,57	1,54	1,09	1,04	1,23	1,60	1,42	1,55	3,01	153,07	6,27	1,74	3,08	0,02	0,14	0	1	1	0	0	0	0
107	1,26	1,16	1,16	1,64	1,56	1,51	1,09	1,02	1,24	1,58	1,41	1,54	3,57	133,91	4,06	0,84	3,46	0,03	0,52	1	1	1	0	1	0	0
108	1,05	0,98	1,01	1,45	1,39	1,31	0,99	0,92	1,11	1,45	1,31	1,40	3,44	200,04	0,00	2,16	3,28	0,04	0,27	1	1	0	0	1	0	0
109	0,92	0,81	0,88	1,23	1,16	1,10	0,87	0,83	0,99	1,27	1,14	1,23	4,66	154,78	2,53	2,28	2,54	0,25	0,53	1	1	0	0	0	0	0
110	0,79	0,69	0,77	1,06	1,00	0,92	0,78	0,72	0,85	1,02	0,95	1,00	3,49	113,34	0,60	3,06	2,71	0,76	0,31	1	1	0	0	0	0	0
111	0,81	0,81	0,83	1,14	1,10	1,07	0,88	0,84	0,90	1,15	1,09	1,14	0,77	135,52	2,69	0,56	0,57	0,56	0,16	0	1	0	0	0	0	0
112	0,80	0,84	0,81	1,12	1,08	1,10	0,85	0,83	0,85	1,11	1,05	1,10	0,26	126,18	0,13	0,64	0,29	0,80	0,04	0	1	0	0	0	0	0
113	0,98	1,00	0,97	1,32	1,23	1,27	0,99	0,99	1,02	1,32	1,23	1,31	0,72	104,71	0,24	1,09	0,32	0,00	0,01	0	1	0	0	0	0	0
114	0,84	0,88	0,84	1,12	1,13	1,12	0,86	0,84	0,87	1,11	1,04	1,10	0,13	161,42	0,77	0,36	1,32	1,37	0,02	0	1	0	0	0	0	0
115	0,70	0,69	0,64	0,89	0,85	0,88	0,63	0,63	0,66	0,83	0,79	0,81	0,91	181,21	13,71	0,68	0,74	1,03	1,72	0	1	1	0	0	0	0
116	0,84	0,85	0,77	1,06	0,99	1,04	0,75	0,73	0,78	1,00	0,93	0,96	1,49	133,01	13,65	0,99	0,78	0,00	1,57	0	1	1	0	0	0	0
117	0,77	0,77	0,71	0,96	0,90	0,98	0,69	0,70	0,71	0,92	0,85	0,87	1,03	122,01	11,52	1,85	0,01	0,14	1,79	0	1	1	0	0	0	0
118	0,64	0,64	0,60	0,80	0,72	0,79	0,61	0,59	0,62	0,76	0,71	0,71	2,53	94,05	5,82	1,77	0,03	0,44	2,02	0	1	1	0	0	0	0
119	0,64	0,68	0,67	0,82	0,79	0,81	0,66	0,63	0,65	0,85	0,80	0,81	0,32	86,57	0,00	0,75	0,77	0,97	0,27	0	1	0	0	0	0	0
120	0,72	0,75	0,78	0,89	0,86	0,92	0,77	0,79	0,79	1,00	0,94	0,96	0,47	44,98	5,31	0,75	0,38	0,72	0,04	0	1	1	0	0	0	0
121	1,13	1,15	1,16	1,14	1,15	1,23	1,12	1,32	1,31	1,60	1,63	1,61	0,48	8,09	15,76	0,13	0,18	6,19	0,26	0	1	1	0	0	1	0
122	1,21	1,28	1,33	1,48	1,45	1,56	1,15	1,30	1,44	1,94	1,96	2,03	1,23	35,51	11,11	0,27	0,14	8,89	0,09	0	1	1	0	0	1	0
123	1,04	1,11	1,08	1,20	1,13	1,22	1,04	1,04	1,19	1,56	1,51	1,58	0,77	34,82	15,50	0,36	0,26	13,28	0,36	0	1	1	0	0	1	0
124	1,06	1,09	1,09	1,34	1,31	1,40	1,13	1,04	1,14	1,44	1,39	1,66	3,47	85,67	5,90	1,47	1,28	3,01	0,53	1	1	1	0	0	0	0
125	0,79	0,81	0,79	0,98	0,94	0,93	0,89	0,84	0,92	1,13	1,04	1,14	1,39	72,27	28,87	0,58	2,23	2,47	0,05	0	1	1	0	0	0	0
126	0,56	0,58	0,59	0,69	0,67	0,66	0,61	0,60	0,65	0,79	0,73	0,78	1,45	94,24	29,24	1,74	1,71	3,66	0,06	0	1	1	0	0	0	0
127	0,51	0,55	0,58	0,64	0,62	0,61	0,56	0,55	0,57	0,74	0,67	0,72	1,09	75,67	15,93	3,12	1,40	8,76	0,47	0	1	1	0	0	1	0
128	0,47	0,48	0,47	0,58	0,56	0,53	0,47	0,48	0,49	0,63	0,58	0,60	0,74	91,06	5,60	2,35	0,90	2,50	0,05	0	1	1	0	0	0	0
129	0,58	0,61	0,54	0,72	0,68	0,68	0,56	0,56	0,60	0,76	0,70	0,74	0,81	90,33	1,46	1,46	2,38	2,31	0,63	0	1	0	0	0	0	0
130	0,77	0,79	0,68	0,92	0,86	0,86	0,71	0,68	0,77	0,96	0,85	0,90	1,84	64,58	0,03	1,48	3,63	1,53	1,69	0	1	0	0	1	0	0
131	1,10	1,19	1,07	1,24	1,20	1,20	0,87	0,90	0,97	1,23	1,09	1,18	0,11	34,67	18,57	1,83	1,87	7,90	0,44	0	1	1	0	0	1	0
132	1,34	1,32	1,18	1,55	1,52	1,56	1,19	1,26	1,42	1,66	1,55	1,74	1,10	81,19	2,76	0,91	4,74	1,79	1,67	0	1	0	0	1	0	0
133	1,37	1,33	1,28	1,57	1,65	1,64	1,36	1,30	1,54	1,79	1,75	1,87	0,62	36,46	4,91	0,14	1,15	0,97	0,40	0	1	1	0	0	0	0

134	1,05	1,06	0,97	1,27	1,26	1,24	1,00	0,96	1,02	1,31	1,21	1,31	0,52	91,57	0,13	0,30	2,13	0,98	0,16	0	1	0	0	0	0	0
135	0,77	0,82	0,75	0,96	0,93	0,92	0,75	0,71	0,75	1,01	0,92	1,00	0,55	72,16	0,00	0,72	1,87	2,98	0,03	0	1	0	0	0	0	0
136	0,80	0,79	0,75	0,98	0,93	0,90	0,71	0,67	0,76	1,01	0,91	0,99	1,76	81,77	0,37	0,53	2,51	4,57	0,07	0	1	0	0	0	1	0
137	0,76	0,75	0,78	0,97	0,90	0,89	0,75	0,72	0,83	1,17	1,04	1,16	2,71	102,56	16,37	1,50	1,28	14,57	0,11	0	1	1	0	0	1	0
138	0,72	0,74	0,77	0,90	0,86	0,83	0,73	0,70	0,77	1,04	0,92	1,02	1,98	92,86	9,28	1,98	1,49	12,58	0,48	0	1	1	0	0	1	0
139	0,68	0,70	0,72	0,88	0,85	0,81	0,69	0,65	0,71	0,94	0,85	0,94	2,27	131,81	2,06	1,19	2,37	5,75	0,63	0	1	0	0	0	1	0
140	0,80	0,83	0,78	1,02	0,99	0,97	0,81	0,73	0,84	1,10	1,00	1,09	1,36	100,67	1,84	0,30	2,94	3,16	0,11	0	1	0	0	0	0	0
141	0,78	0,83	0,77	1,02	0,97	0,98	0,82	0,76	0,82	1,05	0,99	1,04	0,39	59,60	0,54	0,31	0,75	0,34	0,31	0	1	0	0	0	0	0
142	0,97	1,09	0,98	1,27	1,22	1,21	1,04	1,01	1,05	1,31	1,30	1,34	0,07	57,25	2,40	0,48	0,83	1,01	0,58	0	1	0	0	0	0	0
143	1,51	1,73	1,59	2,05	1,87	1,92	1,87	1,87	1,76	1,84	1,98	2,03	0,15	10,80	3,00	0,59	0,08	2,70	1,64	0	1	0	0	0	0	0
144	1,54	1,73	1,58	2,22	2,08	2,09	1,55	1,55	1,51	2,05	1,99	2,06	0,17	100,60	3,25	1,41	0,21	0,01	0,70	0	1	0	0	0	0	0
145	1,25	1,33	1,23	1,76	1,65	1,67	1,27	1,22	1,27	1,76	1,65	1,72	0,49	137,69	0,01	0,98	0,60	0,21	0,28	0	1	0	0	0	0	0
146	1,11	1,19	1,17	1,55	1,47	1,52	1,15	1,10	1,14	1,54	1,41	1,52	0,70	112,27	0,50	1,03	0,56	0,01	0,16	0	1	0	0	0	0	0
147	1,07	1,11	1,11	1,57	1,45	1,46	1,11	1,08	1,15	1,52	1,44	1,52	0,78	132,29	0,07	0,94	0,42	0,08	0,26	0	1	0	0	0	0	0
148	0,92	0,93	0,94	1,28	1,23	1,21	0,97	0,91	1,02	1,33	1,25	1,32	1,12	132,33	2,58	0,62	1,01	0,22	0,08	0	1	0	0	0	0	0
149	0,73	0,78	0,77	0,96	0,98	0,97	0,79	0,74	0,80	1,05	0,99	1,03	0,27	79,63	1,69	0,10	1,02	0,58	0,03	0	1	0	0	0	0	0
150	0,65	0,65	0,69	0,83	0,83	0,80	0,65	0,62	0,69	0,87	0,82	0,85	0,76	80,81	0,17	0,88	0,53	0,67	0,08	0	1	0	0	0	0	0
151	0,83	0,81	0,87	1,13	1,04	1,04	0,81	0,71	0,87	1,15	1,02	1,09	3,64	95,52	0,22	1,83	0,92	1,23	0,03	1	1	0	0	0	0	0
152	0,87	0,90	1,01	1,24	1,17	1,13	0,80	0,75	0,86	1,38	1,13	1,24	1,78	76,54	0,44	2,66	0,89	5,57	0,31	0	1	0	0	0	1	0
153	1,08	1,14	1,27	1,61	1,62	1,46	1,00	0,93	1,04	2,00	1,33	1,59	2,53	74,01	0,65	3,84	3,68	4,30	1,99	0	1	0	1	1	1	0
154	1,69	1,83	2,01	3,08	2,54	2,62	1,11	1,15	1,11	3,38	2,19	2,82	2,60	85,93	5,80	4,11	0,62	7,81	0,66	0	1	1	1	0	1	0
155	2,51	2,80	3,12	5,05	3,99	4,10	2,32	1,95	1,78	4,47	3,41	4,01	1,32	39,60	4,71	1,19	0,15	0,46	0,72	0	1	1	0	0	0	0

**Таблица 8.2.** Трехфакторный дисперсионный анализ изменения значения RMSDL двух моделей белков NIP7-ABY и NIP7-FUR при всех параметрах моделирования.

Номер остатка	NIP7-ABY						NIP7-FUR						F (P)	F (T)	F (Prot)	F (PxT)	F (PxProt)	F (TxProt)	F (PxTxProt)	F (P)	F (T)	F (Prot)	F (PxT)	F (PxProt)	F (TxProt)	F (PxTxProt)	
	300K			373K			300K			373K																	
	0,1 МПа	50 МПа	100 МПа																								
1	1,59	1,43	1,64	1,96	1,46	1,60	1,70	1,59	2,14	2,05	1,90	1,92	1,60	1,22	5,06	1,36	0,58	0,01	0,33	0	0	1	0	0	0	0	0
2	1,33	1,23	1,36	1,81	1,29	1,33	1,45	1,44	1,80	1,67	1,57	1,55	1,27	1,14	3,89	2,21	1,15	0,50	0,30	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1,24	1,15	1,24	1,75	1,19	1,14	1,25	1,25	1,40	1,40	1,28	1,23	1,84	0,76	0,03	2,41	1,19	0,73	0,40	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1,23	1,13	1,23	1,75	1,17	1,11	1,18	1,20	1,32	1,33	1,21	1,14	1,99	0,59	0,21	2,55	1,19	0,75	0,37	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1,21	1,10	1,20	1,74	1,16	1,10	1,13	1,15	1,25	1,28	1,15	1,09	2,12	0,86	0,84	2,43	1,24	0,90	0,37	0	0	0	0	0	0	0	0
6	1,24	1,13	1,21	1,78	1,21	1,15	1,17	1,18	1,26	1,30	1,19	1,13	2,19	1,22	0,93	2,22	1,26	1,05	0,46	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1,27	1,18	1,25	1,79	1,25	1,19	1,23	1,24	1,30	1,35	1,24	1,20	2,10	1,26	0,54	2,17	1,22	1,07	0,57	0	0	0	0	0	0	0	0
8	1,21	1,15	1,21	1,66	1,21	1,16	1,18	1,16	1,23	1,28	1,20	1,17	2,18	1,90	0,95	2,16	1,13	0,92	0,71	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1,26	1,21	1,24	1,61	1,28	1,23	1,21	1,18	1,23	1,30	1,23	1,22	2,53	3,07	2,28	1,92	1,16	0,96	0,76	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1,28	1,29	1,29	1,52	1,33	1,28	1,27	1,24	1,26	1,32	1,28	1,28	2,23	4,75	3,80	2,23	0,79	0,93	1,41	0	1	0	0	0	0	0	0
11	1,29	1,32	1,30	1,40	1,34	1,30	1,30	1,29	1,29	1,33	1,31	1,31	1,16	4,07	1,36	1,30	0,37	0,30	0,83	0	1	0	0	0	0	0	0
12	1,31	1,36	1,34	1,39	1,36	1,32	1,36	1,36	1,35	1,38	1,36	1,37	0,35	0,74	1,06	1,16	0,23	0,03	0,70	0	0	0	0	0	0	0	0
13	1,30	1,39	1,37	1,38	1,36	1,32	1,39	1,40	1,38	1,41	1,38	1,39	0,22	0,00	5,33	1,60	0,49	0,00	1,11	0	0	1	0	0	0	0	0
14	1,34	1,44	1,42	1,41	1,40	1,37	1,48	1,48	1,46	1,47	1,45	1,47	0,39	0,09	12,86	1,23	0,77	0,00	1,14	0	0	1	0	0	0	0	0
15	1,35	1,46	1,43	1,41	1,42	1,39	1,52	1,52	1,50	1,51	1,49	1,51	0,58	0,09	26,41	0,97	0,94	0,02	0,99	0	0	1	0	0	0	0	0
16	1,34	1,48	1,42	1,41	1,43	1,42	1,53	1,54	1,53	1,54	1,53	1,55	1,21	0,09	33,88	0,80	1,39	0,00	0,58	0	0	1	0	0	0	0	0
17	1,33	1,47	1,40	1,40	1,43	1,43	1,51	1,51	1,51	1,52	1,52	1,54	1,45	0,84	24,34	0,57	1,42	0,00	0,51	0	0	1	0	0	0	0	0
18	1,32	1,47	1,39	1,39	1,43	1,44	1,50	1,50	1,51	1,52	1,52	1,54	1,59	1,49	24,16	0,52	1,43	0,01	0,60	0	0	1	0	0	0	0	0
19	1,26	1,39	1,31	1,33	1,36	1,37	1,46	1,46	1,47	1,47	1,48	1,49	1,22	1,36	35,87	0,50	1,05	0,13	0,60	0	0	1	0	0	0	0	0
20	1,15	1,25	1,15	1,22	1,24	1,25	1,35	1,35	1,36	1,37	1,38	1,38	0,61	3,03	53,04	0,38	0,80	0,44	0,63	0	0	1	0	0	0	0	0
21	1,11	1,19	1,09	1,18	1,20	1,20	1,29	1,27	1,31	1,33	1,33	1,33	0,29	5,80	45,90	0,21	0,94	0,25	0,89	0	1	1	0	0	0	0	0
22	1,09	1,16	1,05	1,17	1,18	1,18	1,25	1,21	1,27	1,31	1,30	1,29	0,09	8,77	36,30	0,06	1,10	0,12	1,21	0	1	1	0	0	0	0	0
23	1,07	1,11	1,01	1,16	1,15	1,15	1,22	1,17	1,23	1,29	1,28	1,27	0,30	11,67	35,86	0,03	0,88	0,18	1,05	0	1	1	0	0	0	0	0
24	1,10	1,08	1,06	1,19	1,16	1,14	1,23	1,22	1,21	1,29	1,30	1,25	0,56	5,31	18,18	0,03	0,05	0,24	0,03	0	1	1	0	0	0	0	0

25	1,48	1,37	1,47	1,55	1,49	1,44	1,56	1,67	1,48	1,53	1,54	1,44	0,93	0,03	2,28	0,09	1,31	1,85	0,55	0	0	0	0	0	0	0
26	1,76	1,59	1,82	1,87	1,79	1,76	1,82	1,93	1,66	1,74	1,71	1,61	0,60	0,08	0,07	0,13	1,76	2,44	0,96	0	0	0	0	0	0	0
27	1,83	1,63	1,89	1,92	1,84	1,78	1,91	2,07	1,72	1,78	1,76	1,64	0,79	0,79	0,00	0,11	2,18	3,23	1,46	0	0	0	0	0	0	0
28	1,83	1,61	1,89	1,91	1,83	1,77	1,92	2,09	1,72	1,78	1,75	1,64	0,84	0,95	0,02	0,10	2,35	3,29	1,63	0	0	0	0	0	0	0
29	1,82	1,60	1,90	1,90	1,82	1,76	1,91	2,08	1,71	1,77	1,75	1,64	0,73	0,90	0,03	0,10	2,35	2,89	1,65	0	0	0	0	0	0	0
30	1,81	1,60	1,90	1,88	1,81	1,75	1,90	2,07	1,70	1,77	1,74	1,63	0,65	0,92	0,02	0,11	2,35	2,61	1,64	0	0	0	0	0	0	0
31	1,80	1,59	1,89	1,88	1,80	1,75	1,89	2,07	1,69	1,75	1,73	1,62	0,61	0,91	0,01	0,09	2,38	2,63	1,65	0	0	0	0	0	0	0
32	1,79	1,59	1,88	1,88	1,80	1,75	1,87	2,06	1,67	1,73	1,72	1,61	0,62	0,83	0,00	0,08	2,40	2,88	1,63	0	0	0	0	0	0	0
33	1,80	1,59	1,87	1,88	1,81	1,76	1,86	2,05	1,67	1,73	1,72	1,60	0,62	0,67	0,04	0,08	2,38	3,04	1,60	0	0	0	0	0	0	0
34	1,77	1,57	1,82	1,86	1,80	1,76	1,81	1,98	1,66	1,71	1,68	1,58	0,63	0,36	0,18	0,09	2,19	3,85	1,44	0	0	0	0	0	0	0
35	1,51	1,37	1,53	1,62	1,58	1,56	1,54	1,62	1,45	1,54	1,48	1,41	0,63	0,47	0,21	0,18	1,52	4,02	0,96	0	0	0	0	0	0	0
36	1,20	1,12	1,11	1,29	1,26	1,21	1,22	1,31	1,26	1,34	1,29	1,22	2,82	7,87	11,15	0,93	0,98	3,93	1,65	0	1	1	0	0	0	0
37	1,07	1,04	0,95	1,25	1,19	1,17	1,05	1,10	1,18	1,36	1,24	1,17	1,87	36,59	7,08	2,09	0,58	0,50	3,80	0	1	1	0	0	0	1
38	1,07	1,04	0,93	1,28	1,21	1,18	1,06	1,09	1,20	1,41	1,26	1,18	2,15	36,49	6,70	2,41	0,75	0,52	3,66	0	1	1	0	0	0	1
39	1,11	1,09	0,97	1,36	1,26	1,24	1,13	1,16	1,27	1,48	1,32	1,23	2,38	31,10	7,38	2,53	0,62	0,98	3,07	0	1	1	0	0	0	0
40	1,16	1,14	1,02	1,42	1,32	1,30	1,18	1,22	1,33	1,56	1,38	1,29	2,54	32,85	7,56	2,77	0,51	1,10	3,18	0	1	1	0	0	0	0
41	1,21	1,20	1,07	1,51	1,41	1,37	1,22	1,26	1,42	1,66	1,45	1,37	1,97	34,21	6,75	3,49	0,92	0,98	3,45	0	1	1	1	0	0	1
42	1,44	1,52	1,20	1,78	1,72	1,71	1,32	1,36	1,63	1,87	1,71	1,61	0,44	34,56	0,17	1,24	1,91	0,29	4,77	0	1	0	0	0	0	1
43	1,56	1,70	1,32	2,02	1,87	1,92	1,43	1,44	1,85	2,35	1,88	1,77	1,25	35,14	0,59	3,77	1,83	0,02	6,31	0	1	0	1	0	0	1
44	1,68	1,90	1,43	2,19	2,08	2,08	1,52	1,53	2,04	2,74	2,10	2,01	1,13	37,19	1,28	4,29	2,64	0,67	6,04	0	1	0	1	0	0	1
45	1,88	2,22	1,57	2,47	2,47	2,32	1,68	1,67	2,24	3,09	2,51	2,26	0,94	33,30	0,60	2,79	2,44	1,07	4,82	0	1	0	0	0	0	1
46	1,90	2,26	1,59	2,55	2,71	2,37	1,73	1,68	2,29	3,30	2,74	2,38	0,99	32,32	0,82	2,12	2,20	1,08	3,33	0	1	0	0	0	0	1
47	1,94	2,33	1,64	2,61	2,94	2,43	1,83	1,71	2,38	3,45	2,93	2,51	0,92	28,61	0,96	1,63	2,23	0,89	2,43	0	1	0	0	0	0	0
48	1,98	2,37	1,66	2,70	3,18	2,49	1,87	1,71	2,44	3,69	3,18	2,68	0,95	28,14	1,13	1,48	2,05	1,12	1,88	0	1	0	0	0	0	0
49	2,03	2,44	1,73	2,79	3,32	2,58	1,92	1,72	2,51	3,85	3,31	2,76	0,89	27,84	0,98	1,54	2,00	1,17	1,79	0	1	0	0	0	0	0
50	2,08	2,53	1,79	2,87	3,47	2,68	1,98	1,76	2,55	3,92	3,39	2,82	0,99	28,84	0,70	1,55	2,14	1,02	1,71	0	1	0	0	0	0	0
51	2,08	2,57	1,80	2,92	3,52	2,71	1,99	1,76	2,53	3,96	3,42	2,83	1,09	30,23	0,56	1,55	2,23	1,06	1,73	0	1	0	0	0	0	0
52	1,99	2,44	1,76	2,80	3,39	2,58	1,94	1,71	2,43	3,88	3,32	2,74	1,11	29,28	0,80	1,70	2,12	1,15	1,49	0	1	0	0	0	0	0

53	1.90	2.33	1.69	2.65	3.29	2.45	1.87	1.65	2.28	3.62	3.22	2.64	1.13	26.82	0.67	1.39	1.89	1.05	1.11	0	1	0	0	0	0	0
54	1.79	2.17	1.59	2.50	3.16	2.31	1.78	1.54	2.11	3.33	3.06	2.45	1.24	25.18	0.42	1.33	1.63	0.73	0.87	0	1	0	0	0	0	0
55	1.54	1.81	1.44	2.19	2.89	2.05	1.60	1.33	1.85	2.97	2.73	2.21	1.03	27.15	0.53	1.63	1.70	0.55	0.66	0	1	0	0	0	0	0
56	1.48	1.72	1.39	2.02	2.65	1.93	1.49	1.25	1.74	2.66	2.46	2.02	0.93	26.96	0.22	1.66	1.84	0.52	0.72	0	1	0	0	0	0	0
57	1.39	1.61	1.33	1.90	2.35	1.81	1.35	1.17	1.58	2.41	2.19	1.83	0.92	32.40	0.04	1.73	1.86	0.75	0.92	0	1	0	0	0	0	0
58	1.32	1.54	1.32	1.74	1.96	1.71	1.28	1.17	1.47	2.01	1.81	1.57	0.77	41.38	0.45	2.24	2.56	0.32	1.86	0	1	0	0	0	0	0
59	1.23	1.42	1.25	1.56	1.64	1.54	1.20	1.16	1.35	1.64	1.50	1.40	0.22	31.82	1.89	1.58	1.95	0.01	1.50	0	1	0	0	0	0	0
60	1.17	1.26	1.19	1.47	1.41	1.41	1.16	1.16	1.36	1.52	1.38	1.36	0.26	29.61	0.01	3.02	1.09	0.16	1.52	0	1	0	0	0	0	0
61	1.23	1.24	1.32	1.48	1.37	1.39	1.29	1.28	1.58	1.45	1.37	1.43	2.78	5.02	2.46	3.26	1.20	2.38	0.45	0	1	0	1	0	0	0
62	1.38	1.34	1.47	1.70	1.51	1.50	1.48	1.44	1.90	1.63	1.50	1.62	2.78	1.52	3.35	2.92	1.80	2.51	0.24	0	0	0	0	0	0	0
63	1.54	1.45	1.61	1.90	1.64	1.64	1.72	1.65	2.18	1.88	1.70	1.91	2.90	1.23	7.26	2.00	1.86	1.81	0.09	0	0	1	0	0	0	0
64	1.66	1.53	1.72	2.05	1.75	1.74	1.89	1.82	2.40	2.06	1.85	2.09	2.81	1.00	9.63	1.98	1.87	1.99	0.05	0	0	1	0	0	0	0
65	1.79	1.69	1.89	2.20	1.90	1.89	2.06	2.02	2.58	2.23	2.01	2.25	2.51	0.69	10.50	2.12	1.53	1.99	0.03	0	0	1	0	0	0	0
66	1.83	1.74	1.96	2.26	1.95	1.93	2.13	2.11	2.65	2.31	2.08	2.31	2.33	0.59	11.43	2.24	1.40	2.03	0.01	0	0	1	0	0	0	0
67	1.88	1.79	2.02	2.30	1.99	1.97	2.17	2.16	2.69	2.35	2.12	2.35	2.28	0.42	11.35	2.35	1.33	1.98	0.01	0	0	1	0	0	0	0
68	1.88	1.80	2.02	2.31	2.00	1.97	2.17	2.16	2.69	2.35	2.12	2.35	2.27	0.44	10.95	2.33	1.36	2.03	0.01	0	0	1	0	0	0	0
69	1.87	1.79	2.01	2.29	1.98	1.96	2.15	2.14	2.67	2.32	2.09	2.33	2.26	0.41	10.04	2.31	1.34	2.00	0.01	0	0	1	0	0	0	0
70	1.82	1.77	1.98	2.23	1.93	1.92	2.09	2.08	2.61	2.24	2.03	2.27	2.38	0.23	9.42	2.28	1.34	1.83	0.01	0	0	1	0	0	0	0
71	1.77	1.70	1.89	2.14	1.87	1.86	2.01	2.00	2.47	2.16	1.96	2.18	2.29	0.43	9.25	2.07	1.34	1.77	0.01	0	0	1	0	0	0	0
72	1.64	1.60	1.77	1.94	1.73	1.72	1.87	1.90	2.23	2.00	1.83	2.01	1.97	0.32	11.55	2.06	0.97	1.61	0.01	0	0	1	0	0	0	0
73	1.48	1.49	1.64	1.75	1.61	1.59	1.65	1.72	1.92	1.77	1.64	1.74	1.35	0.32	7.69	2.81	0.46	2.29	0.03	0	0	1	0	0	0	0
74	1.34	1.40	1.51	1.56	1.47	1.47	1.44	1.54	1.62	1.54	1.45	1.50	0.86	0.32	2.11	3.21	0.04	2.03	0.11	0	0	0	1	0	0	0
75	1.16	1.21	1.30	1.33	1.29	1.28	1.21	1.29	1.34	1.30	1.26	1.28	1.13	1.79	0.33	3.28	0.02	1.77	0.14	0	0	0	1	0	0	0
76	1.10	1.16	1.23	1.24	1.22	1.24	1.12	1.18	1.25	1.22	1.20	1.22	2.67	5.25	0.00	2.48	0.00	0.69	0.01	0	1	0	0	0	0	0
77	1.05	1.09	1.14	1.16	1.17	1.20	1.05	1.08	1.16	1.16	1.15	1.17	3.34	12.24	0.06	1.04	0.07	0.23	0.10	1	1	0	0	0	0	0
78	1.05	1.09	1.14	1.14	1.18	1.21	1.08	1.09	1.20	1.18	1.18	1.21	4.43	12.12	1.10	0.59	0.24	0.14	0.27	1	1	0	0	0	0	0
79	1.10	1.15	1.18	1.16	1.22	1.25	1.13	1.13	1.23	1.22	1.23	1.25	4.28	10.89	1.36	0.27	0.46	0.00	0.43	1	1	0	0	0	0	0
80	1.14	1.21	1.23	1.18	1.25	1.28	1.17	1.18	1.26	1.26	1.27	1.29	4.49	7.52	1.47	0.19	0.72	0.50	0.39	1	1	0	0	0	0	0

81	1,19	1,27	1,30	1,18	1,26	1,30	1,19	1,20	1,27	1,28	1,28	1,31	5,41	2,29	0,06	0,12	1,13	3,31	0,22	1	0	0	0	0	0	0	
82	1,25	1,35	1,37	1,21	1,29	1,32	1,24	1,25	1,31	1,31	1,32	1,34	6,13	0,08	0,04	0,12	1,63	7,67	0,13	1	0	0	0	0	0	1	0
83	1,24	1,34	1,37	1,17	1,25	1,28	1,25	1,27	1,31	1,31	1,31	1,34	6,85	0,86	1,49	0,20	1,95	11,03	0,01	1	0	0	0	0	0	1	0
84	1,20	1,31	1,35	1,13	1,20	1,23	1,23	1,25	1,29	1,29	1,29	1,32	7,09	2,76	5,43	0,42	2,21	15,17	0,04	1	0	1	0	0	0	1	0
85	1,17	1,28	1,32	1,09	1,15	1,17	1,21	1,23	1,26	1,26	1,25	1,28	6,04	6,78	8,74	0,59	2,01	15,80	0,10	1	1	1	0	0	0	1	0
86	1,16	1,27	1,29	1,07	1,11	1,13	1,22	1,25	1,25	1,24	1,22	1,26	3,10	11,99	10,90	0,85	1,21	11,29	0,17	0	1	1	0	0	0	1	0
87	1,16	1,28	1,29	1,07	1,10	1,12	1,29	1,36	1,32	1,29	1,26	1,31	2,11	15,38	31,91	1,31	0,74	5,79	0,30	0	1	1	0	0	0	1	0
88	1,21	1,34	1,32	1,12	1,13	1,16	1,50	1,59	1,49	1,47	1,43	1,49	1,16	14,05	90,24	1,83	0,41	2,57	0,36	0	1	1	0	0	0	0	0
89	1,24	1,37	1,31	1,17	1,17	1,20	1,65	1,77	1,65	1,64	1,60	1,68	0,68	6,31	147,31	1,94	0,07	1,29	0,19	0	1	1	0	0	0	0	0
90	1,25	1,39	1,28	1,25	1,23	1,28	1,72	1,85	1,73	1,75	1,70	1,79	0,51	0,82	152,34	2,19	0,02	0,15	0,04	0	0	1	0	0	0	0	0
91	1,19	1,32	1,20	1,27	1,23	1,29	1,73	1,87	1,76	1,78	1,72	1,81	0,39	0,01	164,88	2,37	0,02	0,21	0,02	0	0	1	0	0	0	0	0
92	1,15	1,27	1,11	1,26	1,22	1,28	1,74	1,88	1,76	1,80	1,75	1,84	0,26	0,98	176,49	2,31	0,09	0,71	0,03	0	0	1	0	0	0	0	0
93	1,29	1,34	1,17	1,38	1,33	1,38	1,83	1,95	1,86	1,93	1,89	1,97	0,16	2,83	173,02	1,75	0,34	0,25	0,12	0	0	1	0	0	0	0	0
94	1,42	1,41	1,25	1,48	1,42	1,46	1,89	2,00	1,92	2,02	1,97	2,05	0,20	3,63	155,68	1,37	0,62	0,03	0,24	0	0	1	0	0	0	0	0
95	1,46	1,44	1,27	1,53	1,47	1,50	1,94	2,05	1,96	2,08	2,04	2,11	0,28	4,64	158,43	1,25	0,72	0,01	0,29	0	1	1	0	0	0	0	0
96	1,54	1,48	1,30	1,59	1,52	1,55	2,03	2,13	2,06	2,19	2,15	2,22	0,52	5,89	172,69	1,06	1,06	0,00	0,37	0	1	1	0	0	0	0	0
97	1,65	1,54	1,35	1,68	1,59	1,61	2,08	2,16	2,11	2,28	2,25	2,30	0,89	7,69	155,26	0,80	1,48	0,20	0,49	0	1	1	0	0	0	0	0
98	1,73	1,57	1,37	1,74	1,63	1,62	2,08	2,16	2,12	2,32	2,29	2,31	1,38	7,28	123,00	0,47	1,83	0,58	0,58	0	1	1	0	0	0	0	0
99	1,78	1,57	1,42	1,75	1,64	1,60	2,05	2,14	2,09	2,29	2,26	2,26	1,67	4,65	90,97	0,20	1,85	0,78	0,54	0	1	1	0	0	0	0	0
100	1,88	1,59	1,49	1,75	1,62	1,54	2,15	2,28	2,17	2,35	2,31	2,29	1,93	0,64	86,01	0,06	1,82	1,03	0,53	0	0	1	0	0	0	0	0
101	1,96	1,63	1,58	1,77	1,63	1,53	2,24	2,38	2,24	2,39	2,37	2,33	2,10	0,00	85,73	0,02	1,93	1,25	0,57	0	0	1	0	0	0	0	0
102	2,04	1,73	1,72	1,82	1,67	1,56	2,38	2,58	2,36	2,49	2,44	2,41	1,74	0,89	87,88	0,04	1,59	1,09	0,64	0	0	1	0	0	0	0	0
103	2,05	1,82	1,82	1,84	1,68	1,58	2,47	2,72	2,43	2,53	2,46	2,44	1,35	2,81	86,90	0,22	1,20	0,77	0,69	0	0	1	0	0	0	0	0
104	2,09	1,95	1,94	1,88	1,72	1,64	2,63	2,93	2,58	2,64	2,56	2,57	0,95	5,04	89,60	0,52	0,88	0,53	0,65	0	1	1	0	0	0	0	0
105	2,14	2,03	2,05	1,91	1,75	1,68	2,72	3,04	2,65	2,69	2,60	2,62	0,70	7,05	82,59	0,65	0,72	0,53	0,74	0	1	1	0	0	0	0	0
106	2,12	2,06	2,09	1,91	1,75	1,68	2,71	3,05	2,63	2,64	2,55	2,58	0,59	8,41	72,12	0,77	0,65	0,38	0,86	0	1	1	0	0	0	0	0
107	2,13	2,11	2,16	1,91	1,76	1,70	2,74	3,09	2,63	2,62	2,52	2,57	0,51	10,30	63,62	0,87	0,55	0,23	0,95	0	1	1	0	0	0	0	0
108	2,07	2,08	2,14	1,86	1,72	1,67	2,66	3,02	2,55	2,53	2,42	2,48	0,45	11,67	57,03	0,99	0,54	0,18	1,05	0	1	1	0	0	0	0	0

109	2.00	2.03	2.09	1.80	1.66	1.62	2.58	2.93	2.46	2.43	2.32	2.40	0.39	12.44	54.63	1.11	0.54	0.17	1.11	0	1	1	0	0	0	0
110	1.88	1.96	2.01	1.72	1.59	1.58	2.43	2.75	2.30	2.26	2.17	2.26	0.30	11.70	46.03	1.25	0.50	0.13	1.09	0	1	1	0	0	0	0
111	1.79	1.93	1.97	1.67	1.55	1.56	2.37	2.68	2.23	2.21	2.12	2.22	0.31	11.41	47.44	1.46	0.50	0.12	1.15	0	1	1	0	0	0	0
112	1.87	1.99	2.10	1.64	1.55	1.57	2.73	2.89	2.51	2.33	2.29	2.37	0.10	22.41	79.02	0.63	0.63	0.01	1.29	0	1	1	0	0	0	0
113	1.97	2.10	2.22	1.65	1.56	1.59	2.91	3.03	2.64	2.40	2.38	2.45	0.09	27.24	75.36	0.48	0.66	0.08	1.19	0	1	1	0	0	0	0
114	1.98	2.11	2.23	1.61	1.52	1.56	2.95	3.04	2.65	2.46	2.45	2.51	0.08	25.44	80.92	0.40	0.72	0.53	1.16	0	1	1	0	0	0	0
115	1.98	2.10	2.20	1.66	1.54	1.60	2.95	3.04	2.64	2.56	2.52	2.58	0.09	18.90	87.61	0.51	0.72	0.85	1.02	0	1	1	0	0	0	0
116	1.96	2.08	2.16	1.65	1.51	1.59	2.96	3.05	2.65	2.61	2.56	2.62	0.09	16.86	94.15	0.59	0.71	1.00	0.89	0	1	1	0	0	0	0
117	1.85	1.97	2.05	1.55	1.41	1.50	2.87	2.95	2.58	2.53	2.47	2.52	0.07	16.95	100.45	0.57	0.72	0.91	0.77	0	1	1	0	0	0	0
118	1.78	1.92	2.00	1.49	1.35	1.46	2.83	2.90	2.54	2.48	2.42	2.47	0.04	16.97	101.72	0.58	0.77	0.86	0.74	0	1	1	0	0	0	0
119	1.74	1.90	1.99	1.45	1.32	1.43	2.81	2.87	2.52	2.46	2.39	2.45	0.03	17.19	102.18	0.58	0.82	0.92	0.72	0	1	1	0	0	0	0
120	1.77	1.93	2.00	1.47	1.34	1.45	2.83	2.89	2.54	2.48	2.41	2.47	0.04	17.26	102.12	0.59	0.77	0.99	0.69	0	1	1	0	0	0	0
121	1.80	1.95	2.00	1.49	1.37	1.47	2.83	2.89	2.56	2.50	2.43	2.49	0.04	17.29	104.84	0.63	0.66	1.05	0.61	0	1	1	0	0	0	0
122	1.73	1.90	1.85	1.51	1.38	1.48	2.46	2.64	2.29	2.39	2.27	2.36	0.16	11.37	108.58	1.85	0.46	2.75	0.43	0	1	1	0	0	0	0
123	1.64	1.79	1.69	1.56	1.43	1.51	2.22	2.43	2.15	2.33	2.19	2.29	0.26	3.29	134.44	3.06	0.18	3.34	0.28	0	0	1	0	0	0	0
124	1.66	1.79	1.61	1.68	1.59	1.63	2.18	2.39	2.18	2.39	2.24	2.33	0.48	0.03	141.92	3.09	0.01	1.39	0.13	0	0	1	0	0	0	0
125	1.63	1.78	1.56	1.65	1.59	1.62	2.18	2.35	2.19	2.32	2.20	2.28	0.61	0.01	147.20	2.69	0.08	0.43	0.08	0	0	1	0	0	0	0
126	1.60	1.74	1.51	1.61	1.56	1.58	2.11	2.27	2.13	2.23	2.12	2.19	0.65	0.04	139.79	2.48	0.18	0.18	0.12	0	0	1	0	0	0	0
127	1.62	1.76	1.52	1.63	1.58	1.61	2.16	2.30	2.16	2.29	2.18	2.26	0.62	0.01	145.60	2.36	0.18	0.39	0.09	0	0	1	0	0	0	0
128	1.63	1.77	1.53	1.65	1.60	1.62	2.20	2.34	2.20	2.35	2.25	2.33	0.58	0.17	161.93	2.30	0.18	0.65	0.07	0	0	1	0	0	0	0
129	1.65	1.80	1.56	1.68	1.62	1.65	2.27	2.42	2.27	2.43	2.32	2.40	0.61	0.16	173.98	2.36	0.16	0.67	0.05	0	0	1	0	0	0	0
130	1.65	1.79	1.56	1.68	1.62	1.65	2.28	2.43	2.27	2.42	2.32	2.40	0.64	0.14	178.18	2.43	0.13	0.49	0.05	0	0	1	0	0	0	0
131	1.68	1.84	1.61	1.71	1.63	1.68	2.36	2.53	2.33	2.48	2.37	2.45	0.65	0.02	169.91	2.60	0.03	0.35	0.02	0	0	1	0	0	0	0
132	1.68	1.86	1.63	1.71	1.63	1.68	2.42	2.59	2.35	2.49	2.38	2.45	0.64	0.21	141.23	2.32	0.01	0.09	0.00	0	0	1	0	0	0	0
133	1.68	1.87	1.68	1.69	1.59	1.66	2.52	2.71	2.42	2.54	2.43	2.49	0.49	1.24	130.83	1.90	0.06	0.04	0.05	0	0	1	0	0	0	0
134	1.75	1.98	1.88	1.76	1.62	1.74	2.58	2.83	2.45	2.51	2.40	2.48	0.31	4.62	101.42	2.48	0.43	0.00	0.27	0	1	1	0	0	0	0
135	1.92	2.17	2.12	1.91	1.76	1.93	2.77	3.08	2.64	2.65	2.52	2.61	0.25	6.62	74.28	2.38	0.73	0.04	0.32	0	1	1	0	0	0	0
136	2.10	2.38	2.36	2.08	1.91	2.09	3.05	3.40	2.90	2.90	2.76	2.84	0.25	7.40	69.48	2.23	0.79	0.02	0.37	0	1	1	0	0	0	0

137	2,23	2,53	2,51	2,17	1,99	2,16	3,18	3,58	3,03	3,02	2,86	2,95	0,29	8,80	62,49	2,19	0,78	0,00	0,45	0	1	1	0	0	0	0
138	2,38	2,66	2,67	2,27	2,08	2,22	3,38	3,83	3,22	3,15	2,99	3,07	0,29	11,77	61,62	2,06	0,80	0,02	0,55	0	1	1	0	0	0	0
139	2,48	2,74	2,78	2,34	2,13	2,27	3,54	4,02	3,37	3,27	3,09	3,18	0,28	13,47	62,42	1,93	0,82	0,03	0,62	0	1	1	0	0	0	0
140	2,52	2,80	2,85	2,37	2,16	2,30	3,63	4,13	3,45	3,34	3,16	3,24	0,27	13,84	62,13	1,90	0,82	0,03	0,62	0	1	1	0	0	0	0
141	2,51	2,77	2,85	2,35	2,15	2,27	3,59	4,10	3,43	3,32	3,13	3,21	0,26	13,93	61,10	1,85	0,85	0,02	0,68	0	1	1	0	0	0	0
142	2,50	2,73	2,83	2,34	2,14	2,24	3,52	4,03	3,36	3,29	3,09	3,17	0,26	13,72	59,42	1,87	0,87	0,00	0,77	0	1	1	0	0	0	0
143	2,43	2,65	2,76	2,31	2,12	2,21	3,36	3,86	3,21	3,20	2,99	3,07	0,24	11,94	57,19	2,00	0,95	0,00	0,89	0	1	1	0	0	0	0
144	2,31	2,49	2,63	2,22	2,20	2,07	3,22	3,69	3,07	3,21	2,92	3,03	0,41	6,90	59,73	1,55	0,55	0,03	1,67	0	1	1	0	0	0	0

## Приложение №9

**Таблица 9.1.** Двухфакторный дисперсионный анализ влияния давления и типа домена на изменения значения параметра RMSF модели белка NIP7-ABY при температуре 300К.

Анализ доменов	NIP7-ABY 300K	
	N-домен	C-домен
0,1 МПа	0,84	1,11
	0,76	0,83
	0,94	0,87
	0,90	0,87
	0,85	0,91
50 МПа	0,87	1,06
	0,73	0,78
	0,81	0,90
	0,97	1,01
	0,91	1,00
100 МПа	0,74	0,85
	0,80	0,86
	0,80	0,94
	0,76	0,89
	0,87	1,12

**Таблица 9.2.** Результаты двухфакторного дисперсионного анализа влияния давления и типа домена на изменения значения параметра RMSF модели белка NIP7-ABY при температуре 300К.

NIP7-ABY 300K	SS	df	MS	F
Давление, (P)	0,01	2	0,004	0,44
Домен, (D)	0,07	1	0,07	<b>7,88</b>
(PxD)	0,01	2	0,004	0,42
Ошибка внутри группы	0,21	24	0,01	
Общее	0,29	29	0,08	8,75

**Таблица 9.3.** Двухфакторный дисперсионный анализ влияния давления и типа домена на изменения значения параметра RMSF модели белка NIP7-ABY при температуре 373К.

Анализ доменов	NIP7-ABY 373K	
	N-домен	C-домен
0,1 МПа	1,26	1,24
	1,16	1,22
	1,08	1,20
	1,20	1,31
	1,17	1,26
50 МПа	1,33	1,28
	1,10	1,14
	1,01	1,17
	1,10	1,13
	1,05	1,15
100 МПа	1,09	1,27
	1,03	1,12
	1,01	1,12
	1,06	1,24
	1,08	1,14

**Таблица 9.4.** Результаты двухфакторного дисперсионного анализа влияния давления и типа домена на изменения значения параметра RMSF модели белка NIP7-ABY при температуре 373К.

<b>NIP7-ABY 373K</b>	SS	df	MS	F
Давление, (P)	0,04	2	0,02	<b>4,27</b>
Домен, (D)	0,05	1	0,05	<b>10,04</b>
(PxD)	0,01	2	0,002	0,54
Ошибка внутри группы	0,13	24	0,01	
Общее	0,23	29	0,08	14,85

**Таблица 9.5.** Двухфакторный дисперсионный анализ влияния давления и типа домена на изменения значения параметра RMSF модели белка NIP7-FUR при температуре 300К.

Анализ доменов	<b>NIP7-FUR 300K</b>	
	N-домен	C-домен
0,1 МПа	0,89	0,92
	0,95	0,99
	0,77	0,88
	0,82	0,89
	0,85	0,82
50 МПа	0,82	0,94
	0,83	0,82
	0,81	0,91
	0,78	0,82
	0,79	0,84
100 МПа	0,84	0,89
	0,95	1,02
	0,95	0,94
	0,83	1,01
	0,92	0,85

**Таблица 9.6.** Результаты двухфакторного дисперсионного анализа влияния давления и типа домена на изменения значения параметра RMSF модели белка NIP7-FUR при температуре 300К.

<b>NIP7-FUR 300K</b>	SS	df	MS	F
Давление, (P)	0,03	2	0,02	<b>4,92</b>
Домен, (D)	0,02	1	0,02	<b>5,39</b>
(PxD)	0,0004	2	0,0002	0,06
Ошибка внутри группы	0,08	24	0,00	
Общее	0,14	29	0,04	10,38

**Таблица 9.7.** Двухфакторный дисперсионный анализ влияния давления и типа домена на изменения значения параметра RMSF модели белка NIP7-FUR при температуре 373.К.

Анализ доменов	NIP7-FUR 373К	
	N-домен	C-домен
0,1 МПа	1,12	1,26
	1,21	1,35
	1,10	1,27
	1,15	1,23
	1,10	1,30
50 МПа	1,12	1,14
	1,16	1,18
	1,19	1,11
	1,09	1,26
	1,12	1,06
100 МПа	1,09	1,30
	1,01	1,29
	1,10	1,19
	1,08	1,24
	1,18	1,20

**Таблица 9.8.** Результаты двухфакторного дисперсионного анализа влияния давления и типа домена на изменения значения параметра RMSF модели белка NIP7-FUR при температуре 373К.

NIP7-FUR 373К	SS	df	MS	F
Давление, (P)	0,02	2	0,01	<b>3,68</b>
Домен, (D)	0,08	1	0,08	<b>28,92</b>
(PxD)	0,03	2	0,01	<b>5,05</b>
Ошибка внутри группы	0,07	24	0,002	
Общее	0,20	29	0,11	37,65

## Приложение №10

**Таблица 10.1.** Вероятность белок-белкового взаимодействия по результатам работы сервера SPPIDER. Желтым цветом отмечены остатки, для которых вероятность больше 50%. Сиреневым цветом отмечены замены в модели белка NIP7-ABY относительно модели NIP7-FUR.

	NIP7-ABY		NIP7-FUR	
	А.О.	Вероятность б-б взаимодействия	А.О.	Вероятность б-б взаимодействия
1	L	43	I	82
2	R	35	I	72
3	V	0	A	0
4	R	15	R	47
5	R	11	R	27
6	A	13	A	15
7	S	8	S	12
8	S	21	S	28
9	W	19	W	22
10	E	0	E	0
11	L	23	I	38
12	D	22	D	31
13	L	14	L	17
14	I	0	I	0
15	L	13	L	21
16	K	18	K	17
17	E	0	E	0
18	A	0	A	0
19	E	21	E	21
20	K	15	K	12
21	Y	0	F	0
22	G	8	G	0
23	E	14	T	13
24	L	18	L	49
25	L	17	V	37
26	H	20	H	17
27	E	25	N	38
28	F	11	F	39
29	F	0	F	0
30	C	0	A	0
31	V	0	I	0
32	V	0	V	0
33	E	32	E	49
34	G	54	G	73
35	K	51	K	63
36	Y	42	Y	61
37	R	17	R	23

38	D	33	D	47
39	V	0	V	0
40	Y	40	Y	67
41	A	18	A	0
42	V	0	V	0
43	N	77	N	89
44	E	33	N	56
45	E	22	E	36
46	V	23	V	81
47	W	30	W	53
48	K	22	K	35
49	I	40	I	91
50	I	0	I	0
51	E	22	E	43
52	D	25	D	56
53	I	59	L	94
54	N	40	T	83
55	M	19	V	83
56	R	51	R	84
57	P	75	P	91
58	Y	97	F	98
59	S	89	A	96
60	L	0	L	0
61	G	91	G	96
62	T	93	T	97
63	F	72	F	85
64	V	0	V	0
65	G	0	G	0
66	T	23	M	43
67	I	0	I	0
68	R	46	K	31
69	V	51	V	49
70	D	17	D	17
71	E	68	E	60
72	N	79	N	67
73	L	86	L	83
74	V	48	V	52
75	E	30	E	23
76	K	26	K	22
77	F	0	F	0
78	Y	32	Y	31
79	P	38	P	24
80	N	31	A	38
81	L	75	I	91
82	E	92	E	95
83	F	0	F	0

84	F	0	F	46
85	S	89	T	96
86	L	28	F	72
87	I	14	V	26
88	K	22	D	49
89	L	21	I	43
90	E	24	E	27
91	K	9	K	10
92	N	0	N	0
93	Y	15	Y	17
94	V	0	A	0
95	I	26	V	21
96	L	0	L	0
97	G	13	G	11
98	P	15	P	13
99	K	54	K	47
100	A	32	A	23
101	S	0	S	11
102	F	90	F	68
103	L	92	L	88
104	F	0	F	0
105	T	95	T	84
106	T	95	T	89
107	G	95	G	92
108	K	52	K	40
109	D	48	D	34
110	A	0	V	0
111	P	39	P	34
112	K	28	K	27
113	E	33	K	28
114	A	24	A	23
115	V	27	V	22
116	R	41	R	41
117	E	28	K	25
118	I	21	L	18
119	K	13	V	14
120	W	15	W	12
121	Q	16	K	15
122	G	13	G	13
123	S	8	S	8
124	K	16	K	14
125	R	20	K	13
126	V	0	I	0
127	V	0	V	0
128	V	0	V	0
129	L	32	M	20

130	N	36	N	18
131	D	36	E	28
132	L	72	L	67
133	G	31	G	28
134	D	51	D	41
135	I	69	V	46
136	I	83	L	57
137	G	0	G	0
138	I	30	I	0
139	G	0	G	0
140	L	25	R	18
141	I	9	I	7
142	N	19	N	13
143	P	23	P	13
144	K	34	S	20
145	S	11	N	6
146	D	24	E	17
147	R	18	E	11
148	R	25	K	21
149	F	18	F	21
150	I	0	I	0
151	K	35	K	17
152	N	17	N	12
153	L	63	I	47
154	K	79	T	15