

На правах рукописи



Лисица Альберт Евгеньевич

**МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ ВЯЗКИХ СРЕД НА ОТДЕЛЬНЫЕ СТАДИИ
РЕАКЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗой**

1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Красноярск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), г. Красноярск

**Научный
руководитель:**

Немцева Елена Владимировна,
кандидат физико-математических наук, доцент

**Официальные
оппоненты:**

Трофимов Алексей Владиславович,
доктор химических наук,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
(ИБХФ РАН), г. Москва, заместитель директора по науке,
заведующий лабораторией фото- и хемилюминесцентных
процессов

Чернышев Андрей Витальевич,
кандидат физико-математических наук,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической кинетики и горения им В. В. Воеводского
Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО
РАН), г. Новосибирск, старший научный сотрудник лаборатории
цитометрии и биокинетики

**Ведущая
организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт белка Российской академии наук (ИБ РАН),
г. Пушкино Московской области

Защита диссертации состоится «31» октября 2023 года в 14:00 на заседании диссертационного совета 24.1.228.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБФ СО РАН и на сайте <https://www.ibp.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета



Дементьев Дмитрий Владимирович

Общая характеристика работы

Актуальность темы

Исследование направлено на понимание механизмов, обеспечивающих устойчивость метаболических процессов в клетках, в условиях многокомпонентного неомогенного окружения, изменяющегося под действием внешних факторов (температуры, давления, солености и др.). Во внутриклеточных условиях (*in vivo*) ферментативные реакции протекают под влиянием многих факторов, которые, как правило, не учитываются при стандартных биохимических исследованиях ферментов (*in vitro*). В частности, вязкость внутриклеточной среды может превышать вязкость буферных растворов (воды) в 2-15 раз, в зависимости от типа клеток и их физиологического состояния (Пучков, 2014). Такая вариация может оказывать существенное влияние на метаболизм, поскольку любая биохимическая реакция требует сближения молекулярных клеточных компонент, происходящего во многих случаях путём диффузии. Однако механизмы влияния повышенной вязкости среды на биохимические реакции не ограничиваются замедлением диффузии субстратов и ферментов, но также включают изменение структурно-динамических характеристик макромолекул, что сказывается на их каталитической активности (Sitnitsky, 2010). В ряде работ было показано, что для некоторых типов клеток наблюдается соответствие между высокой внутриклеточной вязкостью и низким уровнем метаболизма (для клеток спор грибов, дрожжей, *E.coli*) (Dijksterhuis *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 1988; Mullineaux *et al.*, 2006). И хотя причинно-следственная связь, лежащая в основе этого совпадения, еще не выяснена (и она может различаться между организмами), предполагается, что такая вязкоадаптация может быть частью стратегии выживания организмов в неблагоприятных условиях (Persson *et al.*, 2020).

Последние десятилетия исследования внутриклеточных условий функционирования белков были сфокусированы на изучении эффекта макромолекулярного краудинга, который является следствием наполненности цитоплазмы различными молекулами, которые занимают до 40% свободного объема (Hollembek *et al.*, 2021). Однако, чтобы однозначно заключить, что тот или иной наблюдаемый эффект обусловлен именно молекулярным краудингом, а не диффузионными процессами, необходимо проведение контрольных экспериментов в условиях повышенной микровязкости. Кроме того, исследования показали, что краудинг-агенты с высокой молекулярной массой в меньшей степени способны воздействовать на каталитическую эффективность ферментов и замедлять диффузию лигандов и процессы фолдинга по сравнению с повышающими микровязкость низкомолекулярными веществами.

Целью данной работы являлось определение общих и специфических механизмов влияния вязких сред на биоломинесцентную реакцию, катализируемую бактериальной люциферазой.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать методику определения констант скорости отдельных стадий реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в буфере и вязких

средах, включающую экспериментальную регистрацию нестационарной кинетики реакции и математическое моделирование кинетики.

2. Проанализировать зависимости констант скорости отдельных стадий реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, от вязкости среды, и установить диффузионно-контролируемые стадии.
3. Определить механизмы влияния сред на вязкостно независимые стадии реакции, катализируемой бактериальной люциферазой.
4. Оценить применимость полученной методики определения скорости отдельных стадий реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, к анализу механизмов влияния других факторов, отличных от вязкости среды.

Научная новизна

В работе впервые получено комплексное описание влияния вязкости среды на многостадийную ферментативную реакцию, включающую химические стадии первого и второго порядка, а также образование интермедиата в электронно-возбужденном состоянии. Для этого разработана методика определения скоростей отдельных стадий реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, состоящая из 1) регистрации нестационарной кинетики реакции при вариации концентрации альдегида, 2) определения скорости формирования окисленного флавина в тупиковых темновых стадиях и 3) математического моделирования набора кинетических кривых. Установлено, что повышенная вязкость среды замедляет как стадию образования комплекса люциферазы с восстановленным флавином, так и стадию темнового распада пероксифлавинового интермедиата реакции. Также впервые показано, что каталитическая константа бактериальной люциферазы не зависит от вязкости среды, что означает отсутствие масштабных движений структуры фермента, сопровождающих каталитический акт. Использование модельных вязких сред с добавлением соразтворителей различного молекулярного размера позволило установить, что 1) распад пероксифлавинового интермедиата реакции зависит от микровязкости вблизи активного центра фермента, и 2) биолюминесцентная реакция бактерий не чувствительна к эффекту макромолекулярного краудинга, смоделированного полиэтиленгликолем и декстраном.

Фундаментальная и практическая значимость полученных результатов

Результаты работы вносят вклад в понимание фундаментальных физико-химических механизмов, лежащих в основе регуляции клеточного метаболизма при вариации факторов, влияющих на скорость биохимических реакций (в первую очередь вязкости и температуры среды). Детально разобранный пример бактериальной люциферазы может быть обобщен на другие ферменты, катализирующие реакции с участием нестабильного субстрата или пероксифлавинового интермедиата, примеры которых многочисленны.

Практическая значимость полученных результатов определяется возможностью их использования для улучшения характеристик (квантового выхода, чувствительности к токсикантам) ферментативных аналитических

систем, разрабатываемых на основе биолюминесцентной реакции бактерий, а также улучшением качества интерпретации результатов биотестирования с использованием разработанных подходов кинетического анализа.

Положения, выносимые на защиту:

1. Общий эффект вязких сред на основе низкомолекулярных соразтворителей глицерина, глюкозы, сорбитола и сахарозы на биолюминесцентную реакцию бактерий заключается в диффузионных ограничениях стадий связывания восстановленного флавина и темнового распада пероксифлавинового интермедиата реакции.
2. Скорость стадии формирования электронно-возбужденного интермедиата реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, (каталитическая константа люциферазы) не зависит от вязкости среды, а определяется спецификой взаимодействия низкомолекулярного соразтворителя с водой.
3. Вязкие среды не изменяют температурный оптимум реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, но замедляют термоинактивацию фермента.

Апробация работы

Основные результаты работы докладывались на следующих научных форумах: XII Международной конференции «Молодежь и наука: проспект Свободный-2016» (г. Красноярск, 15-25 апреля, 2016); V Молодёжной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург, 8-21 сентября, 2016); VI Молодёжной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург, 25–27 апреля, 2018); XV Международной студенческой конференции «Перспектив Свободный-2019» (г. Красноярск, 22-26 апреля, 2019); XX Международном симпозиуме по биолюминесценции и хемилюминесценции (Франция, г. Нант, 28-31 мая, 2018); XXVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021» (г. Москва, 12-14 апреля, 2021); XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспектив Свободный-2021» (г. Красноярск, 19-24 апреля, 2021); конкурсе-конференции молодых ученых Института биофизики СО РАН (г. Красноярск, 30 марта, 2022); XXV Конференции молодых ученых ФИЦ КНЦ СО РАН (г. Красноярск, 14 апреля, 2022), XXIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022» (г. Москва, 11-22 апреля, 2022).

Основные результаты диссертации обсуждались на научных семинарах кафедры биофизики и лаборатории биолюминесцентных биотехнологий ИФБиТ СФУ, лаборатории теоретической химии и биологии Королевского технологического университета (г. Стокгольм, Швеция), а также на научно-образовательном семинаре «Биофотоника», проводимом лабораторией биолюминесцентных биотехнологий совместно с ИИФРЭ СФУ.

Работа была отмечена следующими наградами: Диплом второй степени XXII Международной конференции «Молодежь и наука: проспект Свободный-2016» (г. Красноярск, 15-25 апреля, 2016), Диплом третьей степени конкурса-

конференции молодых ученых Института биофизики СО РАН (г. Красноярск, 30 марта 2022), Диплом третьей степени XXV Конференции молодых ученых ФИЦ КНЦ СО РАН (г. Красноярск, 11-22 апреля 2022), стипендией Фонда Осаму Шимомура 2019 г. за успешное исследование в области биоллюминесценции.

Диссертационная работа была выполнена при поддержке следующих проектов: Государственное задание Министерства образования и науки Российской Федерации на оказание услуг (выполнение работ) в 2017 году, №6.7734.2017/БЧ; Российский фонд фундаментальных исследований, №16-34-00746 мол_а и №18-44-243009 р_мол_а; КГАУ «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» в рамках соглашения №7 от 06.08.2009 и дополнительного соглашения №48/15 от 19.06.2015.

Личный вклад. Представленные в работе результаты были получены автором самостоятельно или при его непосредственном участии. Автор принимал участие во всех этапах исследования: от постановки цели и задач, выбора методов, до проведения расчетов и последующего анализа, обобщения и интерпретации результатов.

Достоверность результатов исследования обеспечивается достаточным объемом данных, их воспроизводимостью, а также использованием при проведении работы современных методов экспериментального исследования и статистического анализа.

Публикации. Основные результаты исследования представлены в 12-ти печатных работах, в том числе в 7-ми статьях в журналах, индексируемом в базах данных Web of Science и/или Scopus, в 5-ти тезисах докладов всероссийских и международных конференций.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав, содержащих обзор литературы, описание методов исследования и результатов, и заключения. Полный объем работы – 123 страницы текста с 33-мя рисунками и 4-мя таблицами. Список литературы содержит 169 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Биологическое значение вариации внутриклеточной вязкости и методы её изучения (обзор литературы)

В главе представлен обзор публикаций по современному состоянию проблемы: обсуждается роль диффузии метаболитов в функционировании живых клеток, принципы измерения внутриклеточной вязкости и зависимость результатов от используемого метода, подходы к изучению влияния вязкости среды на ферментативные реакции (теория Крамерса и кинетический эффект вязкости среды), роль активности воды и исключенного объема в эффектах сред на биохимические процессы. Отдельное внимание уделено объекту исследования – бактериальной люциферазе.

Реакция, катализируемая бактериальной люциферазой, – сложный многостадийный процесс, одним из продуктов которого является видимый свет (Hastings, 1977) (Рисунок 1). Согласно исследованиям люциферазы *Vibrio harveyi*, кинетический механизм реакции включает от 15 до 21 стадий, часть из

которых являются темновыми тупиковыми ответвлениями, снижающими квантовый выход биолюминесценции данного процесса. Люцифераза представляет собой гетеродимер, каждая из субъединиц которого уложена в виде $(\beta/\alpha)_8$ -бочонка. Вблизи активного центра фермента располагается функционально важный неупорядоченный участок – мобильная петля, играющая роль «крышки» после связывания ферментом субстратов (Campbell *et al.*, 2010). Такие структурно-функциональные особенности люциферазы говорят о возможной чувствительности биолюминесцентной реакции бактерий к вязкости среды, но данный вопрос до сих пор не был исследован.

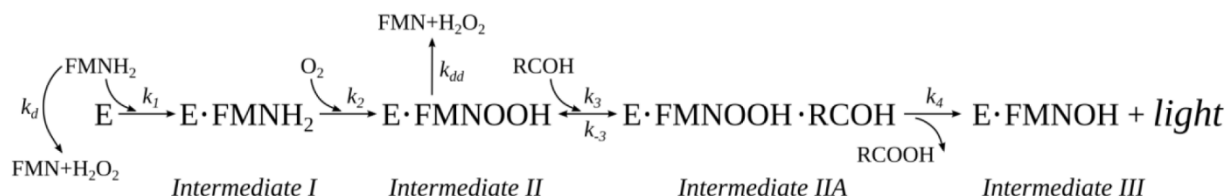


Рисунок 1 – Основные стадии реакции, катализируемой бактериальной люциферазой (E – фермент, RCOH и RCOOH – алифатический альдегид и соответствующая карбоксильная кислота).

Наиболее изученной бактериальной люциферазой в настоящее время является фермент из *Vibrio harveyi*. Недавно методами филогенетического анализа было показано, что все известные бактериальные люциферазы разбиваются на две группы, различающиеся по структурно-функциональным характеристикам: люциферазы видов *Photobacterium*, *Aliivibrio* и *Shewanella* относятся к «быстрым», а люциферазы *Vibrio* и *Photorhabdus* – к «медленным» (Deeva *et al.*, 2016).

Глава 2. Материалы и методы исследования

Глава включает в себя описание методов и подходов, использованных для выполнения диссертационной работы:

1. *Кинетические измерения* были выполнены методом остановленного потока на анализаторе кинетики быстрых процессов SX-20 (Applied Photophysics) при 20 °C, если не указано иное. Спектры поглощения компонентов регистрировали с помощью спектрофотометра Cary 5000 (Agilent Technologies).
2. *Среды с повышенной вязкостью* моделировали добавлением в фосфатный буфер (pH 6,9, 0,05 M) сорастворителей: этиленгликоля (Компонент-реактив), 10–30 вес.%; глицерина (Panreac), 10–40 вес.%; сорбитола (Panreac), 10–40 вес.%; глюкозы (Реахим), 10–40 вес.%; сахарозы (Panreac), 10–40 вес.%; полиэтиленгликоля со средней молекулярной массой 4 кДа (PEG-4k) (Panreac), 5–15 вес.%; декстрана со средней молекулярной массой 70 кДа (Dextran-70k) (Диаэм), 5–15 вес.%. Вязкость растворов этиленгликоля, глицерина, глюкозы, сорбитола и сахарозы брали из литературных данных. Вязкость суспензий PEG-4k и Dextran-70k была оценена экспериментально с помощью молекулярного ротора 9-(2-карбокси-2-циановинил)юлолидина (CCVJ), по методике, представленной в (Gulnov *et al.*, 2016).

3. *Кинетику биолюминесцентной реакции бактерий в нестационарном режиме* регистрировали после смешивания люциферазы *Photobacterium leiognathi* (ИБФ СО РАН), 1,9 μM , с субстратами – восстановленным флавиномононуклеотидом FMNH₂, 30 μM , и деканалем (Acros Organics), 20–100 μM ; оба раствора были приготовлены на основе буфера или вязкой среды.
4. *Восстановление FMN (Sigma-Aldrich) до FMNH₂* проводили фотохимически, освещая его раствор лампой накаливания во внутреннем шприце анализатора кинетики быстрых процессов. Раствор содержал 0,01 М ЭДТА (ROTH) и был предварительно пробарботирован аргоном в течение 10-ти минут для удаления растворенного кислорода (далее по тексту – анаэробный раствор).
5. *Кинетику неферментативного окисления FMNH₂* регистрировали по изменению поглощения на длине волны 445 нм, смешивая анаэробный раствор FMNH₂ (30 μM) с фосфатным буфером или вязкой средой, уравновешенными с воздухом.
6. *Кинетику формирования пероксифлавинового интермедиата реакции* (Интермедиата II) регистрировали по изменению поглощения на длине волны 380 нм, смешивая анаэробный раствор люциферазы *P. leiognathi* (5 μM) и FMNH₂ (30 μM) с фосфатным буфером или вязкой средой, уравновешенными с воздухом.
7. *Кинетику темнового распада Интермедиата II* реакции регистрировали по изменению оптической плотности при 445 нм, смешивая анаэробный раствор, содержащий комплекс люциферазы с восстановленным FMN (Интермедиат I), с фосфатным буфером или вязкой средой, уравновешенными с воздухом.
8. *Аппроксимацию кинетики неферментативного окисления FMNH₂, формирования и темнового распада Интермедиата II* экспоненциальными функциями проводили с помощью OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation).
9. *Математическое моделирование кинетики реакции*, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, проводили с помощью программы, разработанной в пакете Scilab (Scilab Enterprises, France) в Лаборатории теоретической биофизики Института биофизики СО РАН (Красноярск, Россия). Программа осуществляет численное решение системы обыкновенных дифференциальных уравнений, соответствующей кинетической схеме реакции, минимизируя ошибку (отклонение экспериментальных данных от моделируемых), рассчитанную методом наименьших квадратов. Входными данными были 5 кинетических кривых биолюминесценции, полученных при концентрациях деканала 10, 20, 30, 40 и 50 μM . Константы скорости неферментативного окисления FMNH₂, k_d , и темнового распада Интермедиата II, k_{dd} , вычисленные на основе отдельных экспериментов, были зафиксированы при моделировании. Программа находила значения констант скорости k_1 , k_2 , k_3 , k_{-3} и k_4 (Рисунок 1), при которых отклонение пяти моделируемых кинетических кривых от экспериментальных минимально. Относительная ошибка моделирования кинетики биолюминесцентной реакции в буфере и вязких средах не превышала 4%.

10. *Температурные эффекты* на кинетику реакции, катализируемой люциферазами *V. harveyi* (ИБФ СО РАН) и *P. leiognathi* изучали по стандартным методикам. Кинетику биолюминесцентной реакции при температурах 5–45 °С регистрировали как описано в п.3, реакцию запускали после 5-минутной инкубации реагентов при заданной температуре. Скорость термоинактивации люцифераз оценивали путем измерения остаточной активности ферментов при 20 °С после их инкубации в течение различного времени при необходимой температуре в диапазоне 40–55 °С. Для инкубации ферментов использовали твердотельный термостат Гном (ДНК-технологии).
11. *Действие ксенобиотиков* на реакцию, катализируемую люциферазой *P. leiognathi*, изучали путём измерения кинетики биолюминесценции (как описано в п.3) после инкубации либо фермента, либо субстратов с ксенобиотиком. Суспензию из многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) (НПП «Центр нанотехнологий») готовили в 1%-м растворе лаурилсульфата натрия, а затем диспергировали ультразвуком с частотой 35 кГц и мощностью 300 Вт в течение 30 мин (Esimbekova *et al.*, 2017). CuSO₄ (НПФ Невский химик) растворяли в фосфатном буфере. Активность люциферазы в присутствии тритиевой воды определяли после инкубирования фермента в течение 5 мин с тритиевой водой различной специфической радиоактивности или с 3%-м хлоридом натрия (контрольный эксперимент) (Rozhko *et al.*, 2020).
12. *Влияние оксидоредуктазы* на реакцию, катализируемую люциферазой *P. leiognathi*, анализировали путём измерения кинетики биолюминесценции (как описано в п.3) в присутствии NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы *Vibrio fischeri* (ИБФ СО РАН). Концентрация второго фермента в реакционной смеси составляла около 0,075 U.

Глава 3. Выявление вязкостно-зависимых стадий биолюминесцентной реакции бактерий в модельных средах на основе глицерина и сахарозы

В главе предложена модель, описывающая нестационарную кинетику биолюминесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*. Представлены результаты анализа кинетики неферментативного окисления FMNH₂, формирования и распада Интермедиата II реакции, а также в целом биолюминесцентной реакции в буфере и вязких средах с сахарозой и глицерином. Кинетические кривые светоизлучения в ходе биолюминесцентной реакции были аппроксимированы с помощью математической модели, получен набор констант скоростей отдельных стадий, проанализирована их зависимость от вязкости среды.

Для анализа механизмов влияния вязкости на ферментативные реакции использовали полуфеноменологический подход, основанный на описании зависимости скорости элементарной биохимической стадии k от вязкости среды η степенной функцией с показателем δ (Sashi, 2015), который характеризует чувствительность реакции к данной характеристике среды:

$$k \sim \eta^{-\delta}. \quad (1)$$

Была зарегистрирована кинетика биолюминесценции в реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, в средах с различной концентрацией глицерина и сахарозы, методом остановленного потока. Кинетические кривые в нестационарном режиме описывали четырьмя эмпирическими параметрами: максимальная интенсивность $I_{\max}$; константа спада k_{decay} (=показатель экспоненциальной функции, описывающей спад интенсивности после достижения максимума); интегральная интенсивность Q^* (=площадь под кинетической кривой); и начальная скорость реакции v_0 (=тангенс угла наклона начального линейного участка нарастания биолюминесценции). Проанализировав зависимость эмпирических параметров от вязкости среды, установили: (i) кинетические эффекты сахарозы и глицерина различны; (ii) среди всех параметров только начальная скорость v_0 демонстрирует степенную зависимость от вязкости, но показатели степени δ различаются для сред с глицерином и сахарозой (1,85 и 0,67 соответственно); (iii) высокие концентрации глицерина (30 и 40%), в отличие от сахарозы, вызывают уменьшение значения всех параметров.

На следующем этапе исследования был разработан инструмент для определения скоростей отдельных стадий биолюминесцентной реакции бактерий на основе анализа нестационарной кинетики. Предложенные ранее кинетические модели реакции, разработанные только для люциферазы *V. harveyi*, содержат до 21-й стадии, включая тупиковые (темновые) ответвления от основного (светового) пути (Francisco *et al.*, 1993). Однако ключевыми стадиями, обязательно присутствующими во всех моделях, являются показанные на рисунке 1 (Немцева, Кудряшева, 2007): 1) связывание FMNH₂ люциферазой с образованием фермент-субстратного комплекса (Интермедиат I) с константой скорости k_1 ; 2) реакция связанного с люциферазой FMNH⁻ с молекулярным кислородом и образование 4а-гидропероксифламина (Интермедиат II) с константой скорости k_2 ; 3) взаимодействие 4а-гидропероксифламина с альдегидом в активном центре с образованием полуацеталь-4а-гидропероксифламина (Интермедиат IIА) с константой скорости прямой и обратной реакции k_3 и k_{-3} соответственно; 4) разложение полуацеталь-4а-гидропероксифламина на карбоновую кислоту и электронно-возбужденный 4а-гидроксифлавин, связанный с люциферазой, (Интермедиат III) с константой скорости k_4 ; 5) протонирование 4а-гидропероксифламина в составе Интермедиата II и его распад с образованием перекиси водорода (H₂O₂) и FMN с константой скорости стадии k_{dd} . Кроме того, на нестационарную кинетику реакции оказывает влияние процесс неферментативного окисления свободного FMNH₂ с константой скорости k_d .

Опираясь на исследования люциферазы *V. harveyi*, были построены несколько кинетических схем и согласно им, получены модификации математической модели в программном пакете SciLab, разработанной в Лаборатории теоретической биофизики Института биофизики СО РАН (Красноярск). Входным набором данных для модели являются 5 кинетических кривых, измеренных при вариации концентрации одного из субстратов (альдегида). Модель подбирает константы скорости отдельных стадий,

минимизируя отклонение смоделированных кривых от экспериментальных. Было получено, что расширение модели дополнительными стадиями, по сравнению с представленными на рисунке 1, не приводит к улучшению качества аппроксимации кинетических кривых, полученных как в буфере, так и в вязкой среде (Рисунок 2). Модель, основанная на такой «минимальной» схеме реакции, позволяет аппроксимировать экспериментальные кинетические кривые с относительной погрешностью $< 4\%$.

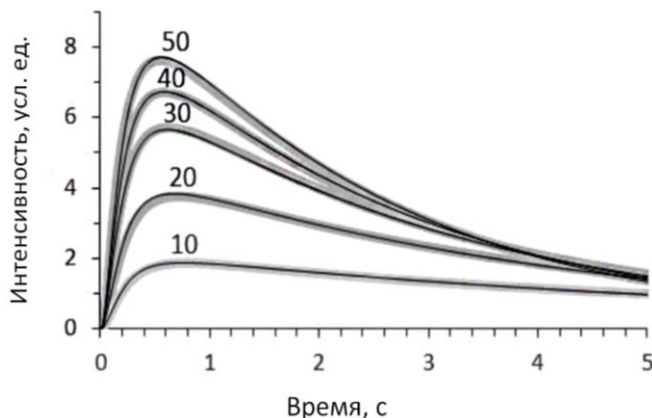


Рисунок 2 – Кинетические кривые билюминесценции в реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, при разных концентрациях деканала (10, 20, 30, 40 и 50 μM) в среде с 30% сахарозы: экспериментальные (серые жирные линии) и смоделированные (черные тонкие линии).

Таким образом, в результате выполнения данного этапа исследования была предложена кинетическая модель реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, которая содержит семь констант скорости, что в 2 раза меньше по сравнению с самой простой ранее опубликованной моделью для люциферазы *V. harveyi* (Abu-Soud *et al.*, 1992). При этом две константы, k_d и k_{dd} , определяются в дополнительных экспериментах и фиксируются во время моделирования.

Далее определяли значения k_d и k_{dd} в вязких средах с глицерином и сахарозой для дальнейшего проведения моделирования кинетики билюминесцентной реакции. k_d (скорость неферментативного окисления FMNH₂) рассчитывали на основе кинетических кривых, полученных по изменению оптической плотности при длине волны 445 нм в течение первых 0,5 с, как описано в Главе 2. Было установлено, что k_d снижается с ростом вязкости по степенной зависимости с показателем $0,81 \pm 0,05$, как для глицерина, так и для сахарозы (Рисунок 3, а).

Кинетические кривые для реакции темнового распада Интермедиата II в вязких средах были получены также по изменению оптической плотности при 445 нм, но в диапазоне 5-15 с. Установлено, что константа скорости этого процесса k_{dd} возрастает при низких концентрациях сахарозы и глицерина, а при дальнейшем росте вязкости (1,3–6,0 сП) снижается по степенной функции с показателем 0,82-0,84, аналогично k_d . Это говорит о высокой степени сопряжения активного центра фермента со средой и характеризует реакцию распада Интермедиата II как процесс, близкий к диффузионно-контролируемому ($\delta=1$) (Лисица и др., 2020).

Возможный механизм наблюдаемого эффекта на Интермедиат II описан в статье (Лисица и др., 2020). На основе молекулярной динамики молекулы люциферазы в присутствии глицерина и сахарозы было сделано предположение

о том, что данный эффект вязких сред является результатом двух разнонаправленных процессов: дестабилизации из-за взаимодействия аминокислотных остатков белка с молекулами вязкого агента и, напротив, стабилизации за счет снижения скорости диффузии продуктов его распада.

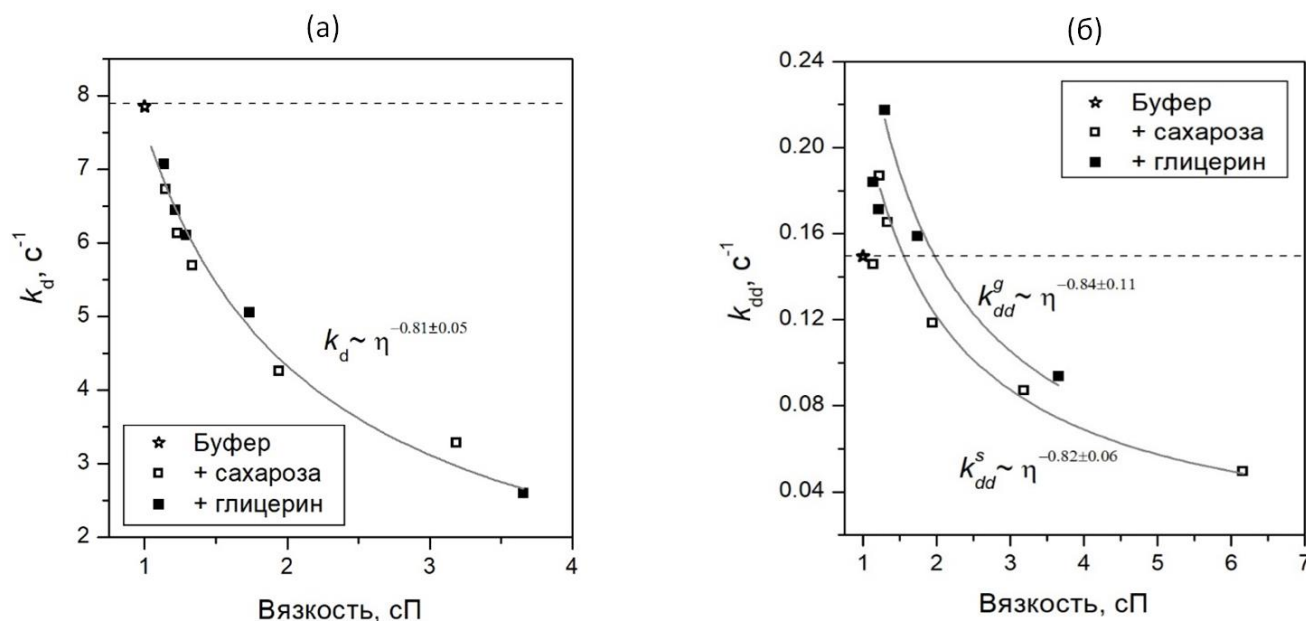


Рисунок 3 – Зависимость k_d (а) и k_{dd} (б) от и вязкости раствора. Линии отражают аппроксимацию данных степенной функцией с указанными показателями (индексы s и g обозначают сахарозу и глицерин соответственно). Горизонтальная штриховая линия указывает значение для буферного раствора (контроль) (Лисица и др., 2020).

Кинетику формирования Интермедиата II реакции регистрировали методом остановленного потока по изменению оптической плотности при 380 нм. Константа скорости процесса была оценена как $k_2=400$ с⁻¹. Это значение использовали как начальное при моделировании кинетики биolumинесценции.

Далее было проведено математическое моделирование кинетических кривых реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, в вязких средах и определены константы скоростей стадий связывания субстратов (k_1 , k_3 , k_{-3}) и формирования электронно-возбужденного Интермедиата III (k_4). k_d и k_{dd} были зафиксированы в ходе поиска решений.

Анализ вязкостных зависимостей показал, что: (i) стадия k_1 – диффузионно-контролируемый процесс ($\delta=0,94$), однако в случае растворов глицерина наблюдается усиленный эффект ($\delta=1,62$). (Рисунок 4, а); (ii) k_2 не чувствительна к замедлению диффузии в использованных условиях эксперимента, её значение определяется как 380-400 с⁻¹ во всех исследованных случаях; (iii) зависимость k_3 от вязкости указывает на наличие дополнительных факторов, усиливающих диффузионное ограничение ($\delta=1,86$ и 1,21 для сред с сахарозой и глицерином соответственно); (iv) k_4 (каталитическая константа люциферазы) не зависит от вязкости среды (Рисунок 4, б).

В статье (Lisitsa *et al.*, 2021) обсуждается специфическое воздействие глицерина и сахарозы на локальную структуру и динамику активного центра фермента, проанализированное с помощью молекулярной динамики. В частности, было показано, что в присутствии сахарозы изменяется конформация боковых цепей, участвующих в связывании флавина, и что молекулы глицерина способны проникать до дна каталитической полости люциферазы, так же глубоко как молекулы воды, в то время как молекулы сахарозы достигают только области около входа в активный центр.

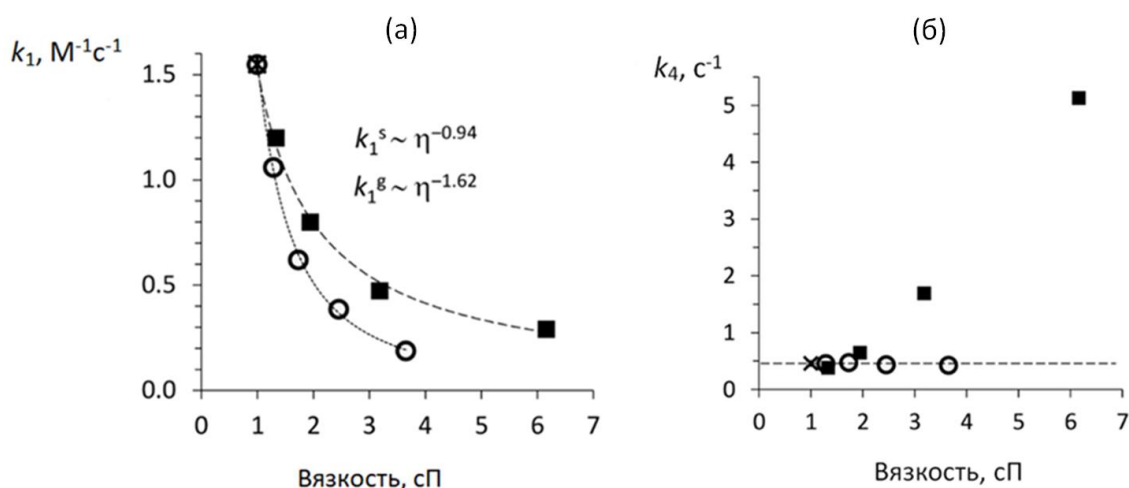


Рисунок 4 – Зависимость k_1 (а) и k_4 (б) от вязкости среды для растворов глицерина (○) и сахарозы (■). Для (а) пунктирные линии представляют аппроксимацию степенной функцией с указанными показателями, для (б) пунктирная линия указывает значение в буферном растворе, отмеченное x. Индексы g и s обозначают глицерин и сахарозу соответственно. (Lisitsa *et al.* 2021)

Таким образом, исследование показало, что для реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, связывание флавина является диффузионно контролируемой стадией, тогда как каталитическая константа фермента не зависит от вязкости среды. Несмотря на замедление с ростом вязкости темновых стадий (k_d и k_{dd}), это не дает кинетических преимуществ для светоизлучающего пути реакции. Глицерин не влияет на каталитическую константу бактериальной люциферазы, при этом замедляет связывание субстратов, что в итоге приводит к уменьшению количества испускаемых квантов света. В то же время сахароза аналогично снижает скорость связывания субстратов, но дополнительно вызывает повышение каталитической эффективности фермента, что приводит к сохранению равновесия между светоизлучающим и темновым путями реакции и сохранению количества испускаемых квантов света. Возможным механизмом различного действия двух соразтворителей на k_4 является изменение подвижности молекул воды в полости активного центра люциферазы, вызванное расположением молекул сахарозы вне этой области, которое не создается глицерином, проникающим в эту полость.

Глава 4. Зависимость кинетических свойств бактериальной люциферазы в вязких средах от физико-химических характеристик молекул сорастворителей

Глава посвящена изучению специфических эффектов сорастворителей с различными физико-химическими характеристиками на отдельные стадии реакции, катализируемой бактериальной люциферазой. Исследовано действие набора сорастворителей с молекулярной массой от 62 до 70 000.

Разработанная методика была использована для изучения кинетики биоллюминесцентной реакции бактерий в средах с различными концентрациями этиленгликоля, глюкозы, сорбитола, полиэтиленгликоля (PEG-4k) и декстрана (Dextran-70k). Для этого были получены k_d и k_{dd} в растворах этих сорастворителей, а затем проведено моделирование кинетических кривых биоллюминесценции и определены константы скорости остальных стадий реакции.

Анализ зависимости k_d от вязкости среды подтвердил диффузионный контроль данного процесса: изменение этой константы скорости хорошо описывается степенной функцией с показателем $\delta=0,86$ для всего набора сорастворителей (аналогично тому, как показано на рисунке 3, а). Для k_{dd} степенная зависимость наблюдалась только в присутствии низкомолекулярных сорастворителей (аналогично тому, как показано на рисунке 3, б), но не краудинг-агентов PEG-4k и Dextran-70k, которые не оказывали существенного влияния на скорость данного процесса. Это указывает на то, что для диффузионного контроля k_{dd} требуется высокая вязкость среды непосредственно вблизи активного центра, где могут присутствовать низкомолекулярные сорастворители, но не могут PEG-4k и Dextran-70k. Этиленгликоль не замедлял распад Интермедиата II возможно потому, что не создавал необходимый уровень вязкости среды, при котором затруднение диффузии может пересилить дестабилизирующее действие на люциферазу.

Анализ эмпирических параметров кинетики биоллюминесцентной реакции ($I_{\max}$, Q^* , k_{decay} , v_0) показал, что действие сорбитола, глюкозы и декстрана сходно с действием сахарозы (Рисунок 5). В присутствии этиленгликоля наблюдается значительное снижение интенсивности излучаемого света и замедляется спад, что в целом похоже на эффекты сред с глицерином, хотя и гораздо сильнее выраженные. Все изученные вязкие среды замедляют v_0 , но только для некоторых из них зависимость $v_0(\eta)$ может быть аппроксимирована степенной функцией, то есть демонстрирует диффузионные ограничения скорость-лимитирующей стадии (Рисунок 5).

Различающиеся эффекты исследованных сорастворителей на кинетические параметры реакции указывают на то, что они не определяются только повышенной вязкостью среды. Путем моделирования кинетических кривых биоллюминесценции по методике, описанной в Главе 3, были вычислены константы скорости отдельных стадий реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в средах с различным содержанием этиленгликоля, глюкозы, сорбитола, PEG-4k и Dextran-70k.

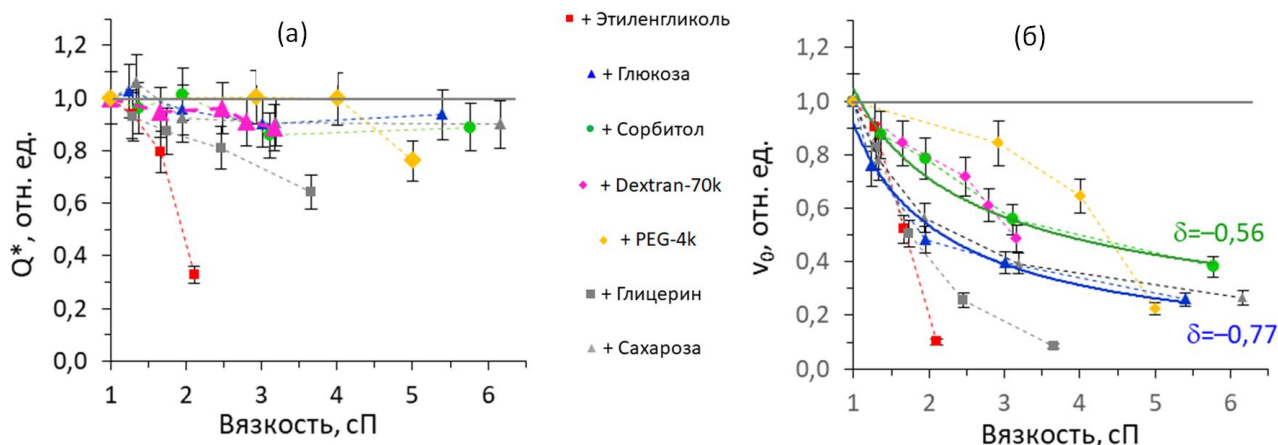


Рисунок 5 – Зависимость Q^* (А) и v_0 (Б) от вязкости среды для кинетических кривых биолуминесценции в реакции с 50 μM деканала в средах с разными соразтворителями. Горизонтальные пунктирные линии показывают значение для буфера (вязкость 1 сП), сплошные линии – аппроксимацию степенной функцией с указанным показателем. Пунктирные линии приведены для наглядности.

Было получено, что в средах с глюкозой, сорбитолом и декстраном зависимость $k_1(\eta)$ характеризуется $\delta=0,97$ (Рисунок 6, а), что близко к характеристике сред с сахарозой и подтверждает диффузионный контроль стадии связывания FMNH₂. В случае этиленгликоля $\delta=1,83$, и данное значение близко к полученному ранее для глицерина (Рисунок 6, а).

Подобно тому, как это было получено ранее, ни один из соразтворителей не оказал существенного влияния на k_2 (связывание кислорода). Наиболее выраженное снижение константы $K_a=k_3/k_{-3}$ (связывание деканала) наблюдалось в растворах глюкозы, сорбитола и сахарозы, в то время как в растворах этиленгликоля и декстрана проявлялась тенденция к усилению связывания альдегида.

Было получено, что каталитическая константа k_4 не зависит от вязкости среды и демонстрирует наибольшую специфику относительно природы соразтворителя (Рисунок 6, б): этиленгликоль уменьшает скорость данного процесса, в то время как сорбитол и глюкоза оказывают активирующий эффект подобно сахарозе.

Растворы краудинг-агентов PEG-4k и Dextran-70k оказывали влияние на k_d и k_1 в соответствии с их кажущейся вязкостью и, подобно остальным соразтворителям, обеспечивали диффузионное ограничение соответствующих стадий. Специфического эффекта макромолекул PEG-4k и Dextran-70k на функционирование бактериальной люциферазы, который мог бы быть отнесён к эффекту исключенного объема, не было выявлено.

Особым случаем среди низкомолекулярных соразтворителей оказался этиленгликоль, что видно по кинетическим параметрам (Рисунки 5, 6) а также структурно-динамическим характеристикам, полученным методами молекулярной динамики. Наши результаты согласуются с ранее опубликованными данными, демонстрирующими, что этиленгликоль предпочтительно накапливается около гидрофобных аминокислотных остатков

белков, что отличает его от других соразтворителей-полиолов и приводит к нетипичному воздействию на стабильность белков (Naidu *et al.*, 2020).

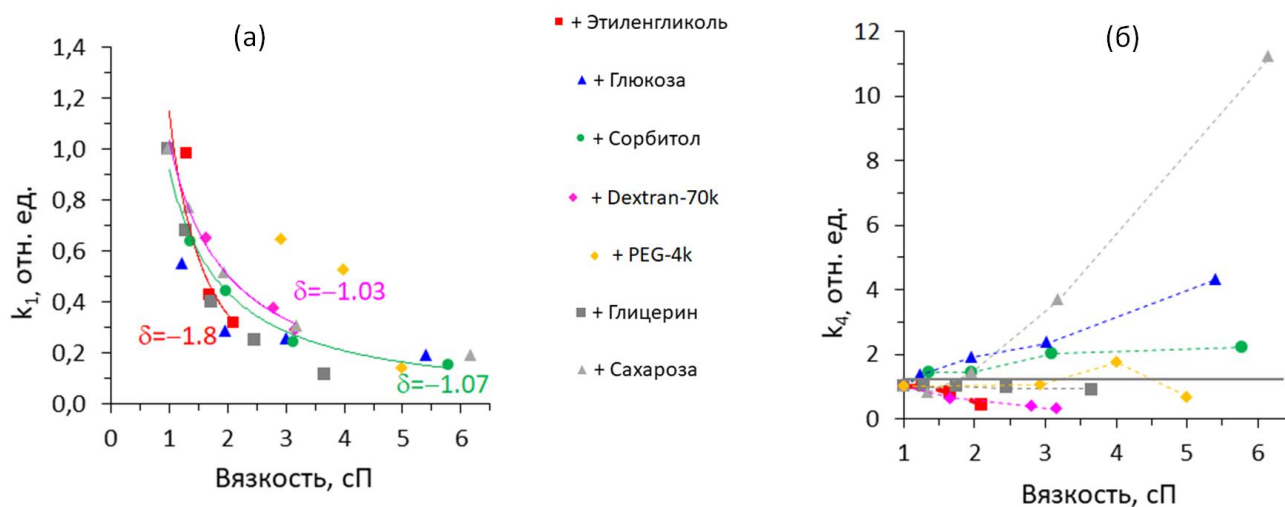


Рисунок 6 – Зависимость константы связывания люциферазы с FMNH₂, k_1 (а), и каталитической константы, k_4 (б) от вязкости среды в растворах этиленгликоля (красный), сорбитола (зелёный), глюкозы (синий), PEG-4k (желтый) и Dextran-70k (розовый). Серыми маркерами показаны параметры для сред с глицерином и сахарозой. Сплошные линии – аппроксимация степенной функцией с указанным показателем. Пунктирные линии приведены для наглядности.

Среди физико-химических характеристик соразтворителей корреляцию со значением k_4 люциферазы проявила константа Норриша (Рисунок 7), которая характеризует способность вещества изменять активность воды a_w . Смысл наблюдаемой корреляции для k_4 заключается в том, что каталитическая способность люциферазы, вероятно, определяется не активностью воды как таковой, а свойством соразтворителя изменять эту активность. Связь скорости ферментативной реакции с активностью воды чаще всего интерпретируют через ослабление/усиление гидрофобных взаимодействий с субстратом вследствие изменения a_w (Mazurkiewicz *et al.*, 2006). Также возможным механизмом может быть изменение динамики молекул воды и/или функциональных групп белка, приводящее к изменению энергии активации каталитического акта.

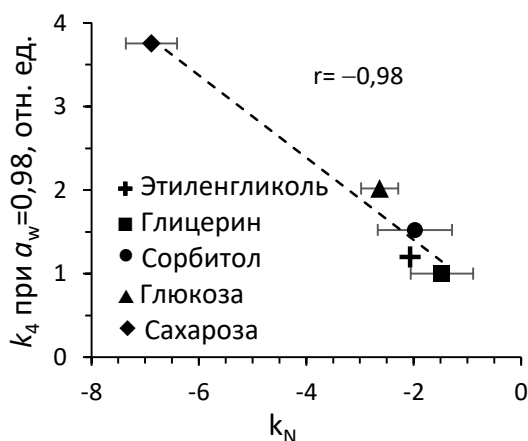


Рисунок 7 – График корреляции между k_4 в растворах с $a_w \approx 0.98$ (этиленгликоль 10%, глицерин 10%, сорбитол 20%, глюкоза 20%, сахароза 30%) и константой Норриша k_N соразтворителей. k_N представлена как (среднее $\pm$ стандартное отклонение) на основе литературы (Maneffa *et al.*, 2017). r – коэффициент линейной корреляции. Пунктиром показана линейная аппроксимация данных.

Глава 5. Применение кинетического анализа реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, для исследования влияния различных факторов

В главе представлены результаты анализа кинетики биолуминесцентной реакции бактерий при вариации температуры и в присутствии ксенобиотиков и сопряженного фермента.

Кинетику биолуминесценции реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi* и *V. harveyi*, изучали при температуре 5-45 °C в буфере и 30% сахарозе (что даёт увеличение вязкости среды приблизительно в три раза) (Рисунок 8). Это позволило сравнить температурные зависимости двух ферментов из разных подсемейств и влияние на них вязкой среды.

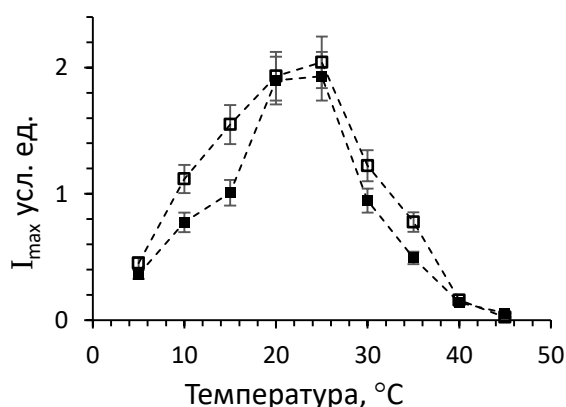


Рисунок 8 — Зависимость $I_{\max}$ реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, от температуры среды в буфере (□) и растворе сахарозы (■). Кинетические кривые были измерены после инкубации реагентов при заданной температуре в течение 5-ти мин.

Исследование выявило различную чувствительность двух люцифераз к температуре: люцифераза *P. leiognathi* реагирует выраженным изменением активности при каждом сдвиге температуры на 5 °C, в то время как люцифераза *V. harveyi* обеспечивает примерно одинаковую максимальную интенсивность в широком диапазоне 20–35 °C. Наблюдаемая термолабильность люциферазы *P. leiognathi* и ее более высокая активность в оптимальных условиях (при 20-25 °C) по сравнению с ферментом *V. harveyi* согласуются с представлениями о структурно-функциональных особенностях холодаадаптированных белков. Анализ активности ферментов в присутствии сахарозы показал, что вязкая среда не дает преимуществ для функционирования бактериальных люцифераз ни при высоких (35-45 °C), ни при низких (5-15 °C) температурах. Более того, при низких температурах сахароза снижает активность люцифераз, вероятно, из-за высокой вязкости раствора, которая приводит к усилению диффузионных ограничений (Deeva *et al.*, 2022).

Для люциферазы *P. leiognathi* были проанализированы корреляции эмпирических параметров кинетики с вычисленными константами скорости отдельных стадий реакции в вязких средах (Глава 4). Было получено, что наиболее сильная корреляция наблюдается между v_0 и k_1 ($r=0,81$). Это означает, что на стадии нарастания биолуминесценции скорость реакции лимитируется скоростью образования Интермедиата I. Для анализа вклада скоростей отдельных стадий в k_{decay} был проведен расчет компонент, входящих в эту константу, согласно уравнению:

$$k_{decay} = \frac{k_{dd} + k_4 \cdot K_a \cdot A}{1 + K_a \cdot A} = \frac{k_{dd}}{1 + K_a \cdot A} + \frac{k_4 \cdot K_a \cdot A}{1 + K_a \cdot A} = f(k_{dd}) + f(k_4), \quad (2)$$

где k_{dd} , k_4 – константы скорости отдельных стадий, согласно рисунку 1, $K_a = k_3/k_{-3}$, A – концентрация альдегида.

Подстановка найденных констант скоростей для вязких сред позволила рассчитать вклады $f(k_{dd})$ и $f(k_4)$. Было получено, что в большинстве случаев вклад $f(k_4)$ составляет $>80\%$, что позволяет интерпретировать изменения k_{decay} как изменения каталитической константы люциферазы k_4 . Анализ температурных зависимостей v_0 и k_{decay} согласно уравнению Аррениуса показал, что вязкая среда не меняет E_a начальной стадии реакции (Рисунок 9, а), которая может характеризовать связывание люциферазой FMNH₂, однако снижает E_a , оцененную по константе спада, что может характеризовать каталитическую константу k_4 (Рисунок 9, б).

Также была измерена остаточная активность люцифераз *V. harveyi* и *P. leiognathi* при 20 °С после инкубации ферментов при различных температурах в течение разных временных интервалов в буфере и в присутствии сахарозы. Было установлено, что люцифераза *V. harveyi* менее чувствительна к нагреванию: ее остаточная активность всегда выше, чем фермента *P. leiognathi* при тех же условиях. Присутствие 30 %-ной сахарозы снижало скорость термоинактивации обеих люцифераз. Стандартный анализ зависимостей скоростей термоинактивации ферментов от температуры позволил оценить энергию активации процесса: E_a в буфере и растворе сахарозы составила 237 ± 30 и 224 ± 7 кДж/моль для люциферазы *V. harveyi* и 255 ± 27 и 243 ± 47 кДж/моль для люциферазы *P. leiognathi* соответственно. Такие значения не позволяют выявить различия термостабильности двух люцифераз.

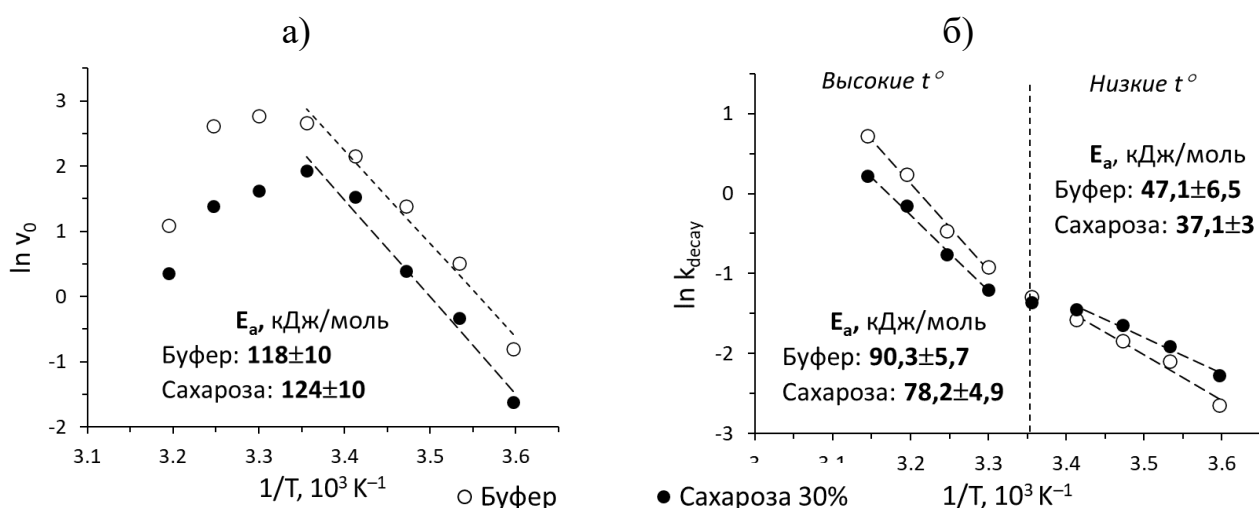


Рисунок 9 – Зависимость эмпирических кинетических параметров реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, от температуры в буфере и сахарозе (в координатах Аррениуса): (а) v_0 ($\sim k_1$); (б) k_{decay} ($\sim k_4$). Указаны энергии активации E_a , вычисленные по линейным участкам. Штриховые линии представляют линейные аппроксимации.

Дополнительно были изучены кинетические характеристики биолюминесцентной реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, в присутствии ксенобиотиков (сульфата меди (II) и многостенных углеродных нанотрубок (MWCNT)) и тритиевой воды. Было получено, что: i) инкубация люциферазы (1 μM) с CuSO_4 (0,62 μM) приводит к инаktivации фермента с $k_{\text{in}} = 0,014 \text{ c}^{-1}$; ii) при анализе эффекта MWCNT наблюдается сильное ингибирование биолюминесцентной реакции лаурилсульфатом натрия (применяемым для приготовления суспензии MWCNT), на фоне которого воздействие нанотрубок является незначительным; iii) тритиевая вода не изменяет кинетических свойств биолюминесцентной реакции.

Заклучение

Раздел содержит выводы и обобщения на основе полученных результатов.

На основе проведенного исследования были сделаны следующие **выводы** относительно влияние вязких сред на стадии биолюминесцентной реакции бактерий:

1) Неферментативное окисление восстановленного флавина является диффузионно-контролируемым процессом.

2) Скорость связывания флавина и темновой распад пероксифлавинового интермедиата реакции являются диффузионно-контролируемыми процессами.

3) Низкомолекулярные соразтворители глицерин и этиленгликоль замедляют стадию связывания восстановленного флавиномононуклеотида с люциферазой в большей степени, чем это обеспечивается вязкостью среды, что может быть обусловлено малым размером молекул этих соразтворителей, благодаря чему они способны проникать глубоко в полость активного центра люциферазы и взаимодействовать с центром связывания субстрата.

4) Этиленгликоль, в отличие от остальных соразтворителей, не оказывает стабилизирующего действия на пероксифлавиновый интермедиат при увеличении вязкости и снижает каталитическую константу люциферазы.

5) Низкомолекулярные соразтворители сорбитол, глюкоза и сахароза, не способные проникать в полость активного центра люциферазы, ускоряют стадию формирования электронно-возбужденного интермедиата реакции. Скорость этой стадии не зависит от вязкости среды, а определяется спецификой взаимодействия низкомолекулярного соразтворителя с водой.

6) Краудинг-агенты полиэтиленгликоль и декстран не оказывают специфического влияния на кинетику реакции, связанного с эффектом исключенного объема, однако замедляют стадию связывания флавина в соответствии с кажущейся вязкостью растворов.

7) Вязкие среды не дают кинетического преимущества при функционировании бактериальной люциферазы за пределами температурного оптимума, но замедляют термоинаktivацию фермента.

В целом, исследование подтверждает, что накопление в бактериальных клетках веществ, повышающих вязкость, может быть одним из механизмов

сохранения нестабильных метаболитов, таких как восстановленный флавиномононуклеотид. Кроме того, интермедиаты биохимических реакций, содержащие аддукт 4a-(гидро)пероксифлавина, выполняют многие важные функции как у прокариот, так и у эукариот, следовательно их стабилизация вязкой средой также может быть одним из биологических механизмов адаптации живых клеток к неблагоприятным условиям.

В работе впервые предложена и использована математическая модель кинетики биолуминесцентной реакции, катализируемой «быстрой» люциферазой *P. leiognathi*. Она оказалась отлична от более ранних моделей, предложенных для реакции «медленной» люциферазы *V. harveyi*, что проливает свет на механизмы, обуславливающие различия в функционировании этих ферментов из разных структурных подсемейств.

В целом, результаты исследования реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, показали, что для поддержания стабильного уровня светового излучения в различных условиях светящиеся бактерии могли вырабатывать некоторую компенсацию замедления кинетики при повышенной вязкости внутриклеточной среды, которая может возникнуть как ответ на воздействие неблагоприятных факторов, за счет более эффективного каталитического акта.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, включенных в перечень ВАК:

1. **Lisitsa A. E.** Mechanisms of viscous media effects on elementary steps of bacterial bioluminescent reaction / **A.E. Lisitsa**, L.A. Sukovaty, S.I. Bartsev, A.A. Deeva, V.A. Kratasyuk, E.V. Nemtseva // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – №. 16. – P. 8827. **(Q1)**
2. **Лисица А.Е.** Вязкие среды замедляют распад ключевого интермедиата биолуминесцентной реакции бактерий / **А.Е. Лисица**, Л.А. Суковатый, В.А. Кратасюк, Е.В. Немцева // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2020. – Т. 492. – №. 1. – С. 320-324.
3. Deeva A. A. Structure-function relationships in temperature effects on bacterial luciferases: nothing is perfect / A. A. Deeva, **A.E. Lisitsa**, L.A. Sukovaty, T.N. Melnik, V.A. Kratasyuk, E.V. Nemtseva // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – №. 15. – P. 8119. **(Q1)**
4. Суковатый Л.А. Влияние осмолитов на биолуминесцентную реакцию бактерий: структурно-динамические аспекты / Л.А. Суковатый, **А.Е. Лисица**, В.А. Кратасюк, Е.В. Немцева // Биофизика. – 2020. – Т. 65. – №. 6. – С. 1135-1141.
5. Rozhko T.V. Enzymatic responses to low-intensity radiation of tritium / T.V. Rozhko, E.V. Nemtseva, M.V. Gardt, A.V. Raikov, **A.E. Lisitsa**, G.A. Badun, N.S. Kudryasheva // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – №. 22. – P. 8464. **(Q1)**
6. Esimbekova E.N. Bioluminescent enzyme inhibition-based assay to predict the potential toxicity of carbon nanomaterials / E.N. Esimbekova, E.V. Nemtseva, A.E. Bezrukikh, G.V. Jukova, **A.E. Lisitsa**, V.I. Lonshakova-Mukina, N.V. Rimatskaya,

O.S. Sutormin, V.A. Kratasyuk // *Toxicology in Vitro*. – 2017. – Vol. 45. – P. 128-133. (**Q1**)

7. Сутормин О.С. Ферментативное биотестирование почв: сравнение чувствительности к токсикантам моно-, би- и триферментной систем / О.С. Сутормин, Е.М. Колосова, Е.В. Немцева, О.В. Искорнева, **А.Е. Лисица**, В.Р. Матвиенко, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // *Цитология*. – 2018. – Т. 60. – № 10. – С. 826-829

Тезисы в сборниках материалов конференций:

1. **Lisitsa A.E.** Optical correction of the results of bioassays based on bacterial bioluminescence in vitro applied to nanoparticles / **A.E. Lisitsa**, E.V. Nemtseva, V.A. Kratasyuk // *Luminescence*. – 111 River St, Hoboken 07030-5774, NJ USA : Wiley-Blackwell, 2014. – Vol. 29. – P. 74-75

2. Деева А.А. Роль структурных особенностей бактериальных люцифераз в обеспечении их кинетических свойств / А.А. Деева, **А.Е. Лисица** // *Ломоносов-2021*. – 2021.

3. Суковатый Л.А. Механизмы влияния осмолитов на биолюминесцентную реакцию бактерий / Л.А. Суковатый, **А.Е. Лисица** // *Ломоносов-2021*. – 2021.

4. Суковатый Л. А. Роль специфических взаимодействий в эффекте вязких сред с глицерином и сахарозой на биолюминесцентную реакцию бактерий / Л.А. Суковатый, **А.Е. Лисица**, Е.В. Немцева // *Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России*. – 2019. – С. 89-90.

5. Немцева Е. В. Структурно-функциональные особенности бактериальных люцифераз / Е.В. Немцева, **А.Е. Лисица**, А.А. Деева, Д. В. Гульнов, Л. А. Суковатый, В.А. Кратасюк, // *Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России*. – 2019. – С. 124-124.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Немцева Е.В. Механизм электронного возбуждения в биолюминесцентной реакции бактерий / Е.В. Немцева, Н.С. Кудряшева // *Успехи химии*. – 2007. – Т. 76. – №. 1. – С. 101-112.

Пучков Е.О. Внутриклеточная вязкость: методы измерения и роль в метаболизме / О. Е. Пучков // *Биологические мембраны*. – 2014. – Т. 31. – №. 1. – С. 3-13.

Abu-Soud H. Stopped-flow kinetic analysis of the bacterial luciferase reaction / H. Abu-Soud, L.S. Mullins, T. O. Baldwin, F.M. Raushel // *Biochemistry*. – 1992. – Vol. 31. – №. 15. – P. 3807-3813.

Campbell Z. T. Analysis of the bacterial luciferase mobile loop by replica-exchange molecular dynamics / Z.T. Campbell, T.O. Baldwin, O. Miyashita // *Biophysical journal*. – 2010. – Vol. 99. – №. 12. – P. 4012-4019.

Deeva A. A. Structural distinctions of fast and slow bacterial luciferases revealed by phylogenetic analysis / A.A. Deeva, E.A. Temlyakova, A. A. Sorokin, E.V. Nemtseva, V.A. Kratasyuk // *Bioinformatics*. – 2016. – Vol. 32. – №. 20. – P. 3053-3057.

Dijksterhuis J. High viscosity and anisotropy characterize the cytoplasm of fungal dormant stressresistant spores. / J. Dijksterhuis, J. Nijse , F.A. Hoekstra, E.A. Golovina // *Eukaryotic cell*. – 2007. – Vol. 6. – №. 2. – P. 157-170.

Francisco W. A. Interaction of bacterial luciferase with aldehyde substrates and inhibitors / W.A. Francisco, H.M. Abu-Soud, T.O. Baldwin, F.M. Raushel // *Journal of Biological Chemistry*. – 1993. – Vol. 268. – №. 33. – P. 24734-24741.

Gulnov D.V. Contrasting relationship between macro-and microviscosity of the gelatin-and starch-based suspensions and gels / D.V. Gulnov, E.V. Nemtseva, V.A. Kratasyuk // *Polymer Bulletin*. – 2016. – Vol. 73. – P. 3421-3435.

Hashimoto Y. Measurement of cytoplasmic viscosity by fluorescence polarization in phy tohemagglutinin stimulated and unstimulated human peripheral lymphocytes. / Y. Hashimoto, N. Shinozaki // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 1988. – Vol. 36. – №. 6. – P. 609-613.

Hastings J. W. Bacterial bioluminescence / J.W. Hastings, K.H. Nealson // *Annual review of microbiology*. – 1977. – Vol. 31. – №. 1. – P. 549-595.

Hollembeak M. Macromolecular crowding: A hidden link between cell volume and everything else / M. A. M. J. E Hollembeak, M. Kurokawa // *Cell Physiol Biochem*. – 2021. – Vol. 55. – №. S1. – P. 25-40.

Maneffa A.J. Water activity in liquid food systems: A molecular scale interpretation / A. J. Maneffa, R. Stenner, A.S. Matharu, J. H. Clark, N. Matubayasi, S. Shimizu // *Food chemistry*. – 2017. – Vol. 237. – P. 1133-1138.

Mazurkiewicz J. Dextran–low-molecular saccharide sweetener interactions in aqueous solutions / J. Mazurkiewicz, K. Rębilas, P. Tomasik // *Food hydrocolloids*. – 2006. – Vol. 20. – №. 1. – P. 21-23.

Mullineaux C.W. Diffusion of Green Fluorescent Protein in three cell environments in *Escherichia coli*. / C.W. Mullineaux, A. Nenninger, N. Ray, C. Robinson // *Journal of bacteriology*. – 2006. – Vol. 188. – №. 10. – P. 3442-3448.

Naidu K. T. Cryo vs thermo: duality of ethylene glycol on the stability of proteins / K.T. Naidu, D. K. Rao, N. P. Prabhu // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2020. – Vol. 124. – №. 45. – P. 10077-10088.

Persson L. B. Cellular control of viscosity counters changes in temperature and energy availability / L. B. Persson, V. S. Ambati, O. Brandman // *Cell*. – 2020. – Vol. 183. – №. 6. – P. 1572-1585.

Sashi P., Bhuyan A. K. Viscosity dependence of some protein and enzyme reaction rates: seventy-five years after Kramers / P. Sashi, A.K. Bhuyan // *Biochemistry*. – 2015. – Vol. 54. – №. 29. – P. 4453-4461.

Sitnitsky A.E. Model for solvent viscosity effect on enzymatic reactions / A.E. Sitnitsky // *Chemical Physics*. – 2010. – Vol. 369. – №. 1. – P. 37-42.