

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Сибирский федеральный университет»

На правах рукописи



Лисица Альберт Евгеньевич

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

1.5.2. Биофизика

Научный руководитель:
Кандидат физико-математических наук, доцент
Немцева Е.В.

Красноярск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. Биологическое значение вариации внутриклеточной вязкости и методы её изучения (обзор литературы).....	8
1.1 Понятие вязкости и проблема её определения для внутриклеточной среды....	8
1.2 Анализ влияния вязкости среды на биохимические процессы.....	18
1.2.1 Теория Крамерса.....	18
1.2.2 Кинетический эффект вязкости растворителя.....	25
1.2.3 Роль активности воды в эффектах сорастворителей на ферменты.....	30
1.2.4 Эффект исключенного объема и его влияние на биохимические процессы	32
1.3 Диффузия внутри клеток и метаболизм.....	34
1.3.1 Общие принципы диффузии во внутриклеточном пространстве и её биологическая роль.....	34
1.3.2 Стратегия вязкоадаптации клеток.....	38
1.4 Эффекты сред на биолюминесцентную реакцию бактерий.....	40
1.4.1 Механизм реакции, катализируемой бактериальной люциферазой.....	40
1.4.2 Эффекты сред на реакцию, катализируемую бактериальной люциферазой	48
1.5 Заключение к главе.....	50
ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования.....	51
2.1 Реактивы и оборудование.....	51
2.2 Методика экспериментов.....	52
2.3 Обработка экспериментальных данных.....	53
ГЛАВА 3. Выявление вязкостно-зависимых стадий биолюминесцентной реакции бактерий в модельных средах на основе глицерина и сахарозы.....	55
3.1 Влияние вязких сред на нестационарную кинетику реакции, катализируемой бактериальной люциферазой <i>P. leiognathi</i>	55
3.2 Разработка модели для описания нестационарной кинетики реакции, катализируемой бактериальной люциферазой <i>P. leiognathi</i>	57
3.3 Эффект вязких сред на элементарные стадии реакции, катализируемой бактериальной люциферазой <i>P. leiognathi</i>	62
3.4 Совокупное влияние на кинетические и каталитические характеристики биолюминесцентной реакции бактерий вязких сред с глицерином и сахарозой...	70
3.5. Заключение к главе.....	74

ГЛАВА 4. Зависимость кинетических свойств бактериальной люциферазы в вязких средах от физико-химических характеристик соразтворителей.....	75
4.1 Влияние соразтворителей различных молекулярных размеров на отдельные стадии реакции, катализируемой бактериальной люциферазой.....	75
4.2 Кинетические эффекты сред с различными молекулярными размерами на биолюминесцентную реакцию, катализируемую бактериальной люциферазой...	79
4.3. Зависимость констант скорости отдельных стадий реакции от вязкости среды.....	82
4.4 Связь кинетических параметров с характеристиками молекул соразтворителей.....	84
4.5 Заключение к главе.....	89
ГЛАВА 5. Применение кинетического анализа реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, для исследования влияния различных факторов.....	90
5.1. Активность люцифераз <i>V. harveyi</i> и <i>P. leiognathi</i> при различных температурах в условиях повышенной вязкости.....	90
5.2 Изучение механизмов влияния различных факторов на ферментативные биотестовые системы.....	99
5.3 Заключение к главе.....	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	109

ВВЕДЕНИЕ

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 [1]. 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 [2]. 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*) [3-5]. 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 [6].

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 [7]. 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 вязкости. 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 вязкость низкомолекулярными веществами.

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

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

1. Разработать методику определения констант скорости отдельных стадий реакции, ката-

лизируемой 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 пероксифлавино-

вого 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 теорети-

ческой 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: перспектив-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 биолюминесценции.

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.

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

1.1 Понятие вязкости и проблема её определения для внутриклеточной среды

Вязкость жидкостей

В основе понятия вязкости лежит свойство жидкости оказывать сопротивление перемещению одной части относительно другой. Силы давления одного элемента жидкости на другой направлены перпендикулярно его поверхности. Однако текучие элементы жидкостей также могут проскальзывать относительно друг друга, создавая силу трения, направленную по касательной к поверхности этих элементов, называемую «вязкой силой». Величина вязкой силы f_v прямо пропорциональна площади поверхности скольжения жидкости. Сила вязкости, действующая на слой жидкости толщиной dx , обратно пропорциональна этому значению. Эмпирически было получено, что сила вязкости также линейно возрастает с разницей в скорости между верхним и нижним слоями, когда они сдвигаются относительно друг друга со скоростью dv (до тех пор, пока разница в скорости не слишком велика) [8]. Если жидкость несжимаема и вязкость постоянна во всем объёме жидкости, то касательное напряжение в прямоугольной системе координат выражается уравнением:

$$f_{v,ij} = \eta \cdot A \left(\frac{dv_i}{dx_j} + \frac{dv_j}{dx_i} \right). \quad (1)$$

Коэффициент пропорциональности η называется динамической вязкостью, или сдвиговой вязкостью. Жидкость с большей вязкостью требует большей силы для непрерывного сдвига слоёв. Единицей вязкости в системе СГС является пуаз, равный $1 \text{ г} \cdot \text{см}^{-1} \text{с}^{-1}$.

В общем случае, вязкие жидкости будут бесконечно мало смещаться относительно находящихся бесконечно близко фиксированных границ, с которыми они взаимодействуют. Это так называемое граничное условие отсутствия скольжения. На молекулярном уровне эту концепцию нетрудно представить: молекулы жидкости могут быть захвачены и обездвижены на короткое время шероховатостями поверхности, даже если эта шероховатость имеет молекулярный масштаб. Более того, те молекулы жидкости, которые притягиваются к твердым поверхностям, в свою очередь воздействуют на следующий слой жидкости за счет вязкой силы.

Жидкости, подчиняющиеся уравнению (1), называются *ньютоновскими*. Из определения, в частности, следует, что ньютоновская жидкость продолжает течь, даже если внешние силы незначительны, но не равны нулю [9].

Жидкости, не подчиняющиеся уравнениям (1), называют *неньютоновскими*. Примерами неньютоновских жидкостей могут быть полимеры, твердые суспензии и большинство очень вязких жидкостей [9].

Для большинства жидкостей существует сильная зависимость вязкости от температуры. Вязкость газов имеет тенденцию к увеличению с повышением температуры (пропорционально $T^{1/2}$), в то время как вязкость обычных жидкостей с повышением температуры уменьшается (часто экспоненциально). Вязкость воздуха при стандартной температуре и давлении составляет $1,8 \times 10^{-2}$ сП, увеличиваясь примерно на 0,3% на каждый градус по шкале Кельвина. Вода имеет вязкость 1,0 сП при 20 °C и давлении равно одной атмосфере, уменьшаясь примерно на 2% на градус по мере повышения температуры.

Модель Аррениуса с использованием молекулярной кинетики предсказывает, что для простой (ньютоновской) жидкости зависимость вязкости от температуры будет содержать фактор Больцмана $e^{(-E/RT)}$, где E – энергия активации на один моль, R – газовая постоянная. Используя $1/T = 1/(T_0 + T_C) \approx (1 - T_C/T_0)/T_0$, для ограниченного диапазона температур можно записать:

$$\eta = \eta_0 \cdot \exp(-a \cdot T_C), \quad (2)$$

где T_C – температура в градусах Цельсия.

Например, для воды в диапазоне 10-70 °C температурная зависимость вязкости (в сП) удовлетворительно описывается уравнением $\eta = (37/25) \cdot \exp(-T_C/52)$.

Понятие кинематической вязкости применяется для измерения вязкости с помощью капиллярных вискозиметров. Она определяется как отношение динамической вязкости к плотности раствора.

Вязкость внутриклеточной среды и методы её измерения

Биохимические реакции традиционно изучают в разбавленных растворах солей (буферах), в больших по сравнению с размерами клеток объемах. Эти условия значительно отличаются от условий функционирования ферментов в физиологической среде. Внутри клеток жидкие компоненты формируют разнообразные микросреды, крайне неоднородные как по составу, так и по пространственной организации. Этот фактор значительно влияет на скорость биохимических реакций и химическое равновесие. Однако, результаты попыток охарактеризовать поведение отдельных белков и других макромолекул непосредственно в живых клетках оказываются, как правило, трудно интерпретируемыми из-за чрезмерной сложности системы. Для преодоления разрыва между традиционными исследованиями *in vitro* и более поздними попытками изучения реакций в интактных клетках (*in vivo*) может быть использовано изучение биохимической кинетики в хорошо охарактеризованных средах, предназначенных для моделирования одного или нескольких (но не всех одновременно) свойств среды живых клеток [10].

Выделяют четыре так называемых элемента сложности внутриклеточной среды [10]:

1) Наличие локально высоких концентраций макромолекул разных видов, которые могут взаимодействовать друг с другом как специфически, так и неспецифически, замедляя диффу-

зию, влияя на активность воды [11] и увеличивая значение исключенного объема среды [12]. Такие взаимодействия влияют как на процессы ассоциации/диссоциации, так и на химический потенциал или реакционную способность отдельных видов (макро)молекул.

2) Наличие разделённых фаз (компарментов), в которых могут происходить реакции. Примером могут быть безмембранные органеллы, возникающее в результате фазовых переходов жидкость-жидкость [13].

3) Динамическая природа и подверженность изменениям в зависимости от условий эксперимента.

4) Наличие подвижных и стационарных препятствий для свободной диффузии (макро)молекулярных реагентов.

Вязкость, наряду с активностью воды, кислотностью и ионной силой, является одним из основных параметров водной среды внутри клетки, определяющих условия протекания в ней физико-химических процессов, в том числе диффузии молекул. Ни один из наиболее часто используемых методов измерения вязкости *in vitro*, таких как ротационная или капиллярная вискозиметрия, не может быть применен *in vivo*, в живых клетках. Поэтому разработка методов измерения внутриклеточной вязкости оказалась особой исследовательской задачей, требующей применения иных принципов.

Большинство методов оценки внутриклеточной вязкости, разработанных на сегодняшний день, основаны на измерении вращательной или поступательной диффузии определенных репортерных молекул. Это такие методы как ЭПР, ЯМР и флуоресцентная спектроскопия. Связь между вращательной и поступательной диффузией молекул и вязкостью среды описывается следующими уравнениями Стокса–Эйнштейна:

$$D_r = \frac{k_B T}{8\pi\eta r^3}, \quad (3)$$

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}, \quad (4)$$

где D_r и D – коэффициенты вращательной и поступательной диффузии соответственно; k_B – постоянная Больцмана; T – абсолютная температура; η – вязкость; r – радиус молекулы.

Измерения внутриклеточной вязкости обычно охватывают область клетки, где расположен зонд, и характеризуют то, что можно назвать микровязкостью. Априори физические свойства цитоплазмы и/или органелл пространственно неоднородны [14]. Отсюда можно ожидать, что результаты оценки микровязкости в клетках могут зависеть от того, какой тип диффузии (т.е. вращательная или поступательная) выбран для измерений. Кроме того, результаты этих

измерений зависят от физико-химических свойств зондов, в частности от их способности связываться с внутриклеточными структурами. Наконец, для расчета вязкости по поведению зондов, как правило, используют общепринятые формулы и уравнения, выведенные теоретически для идеальных физических систем. Поэтому, рассматривая результаты измерений внутриклеточной вязкости различными методами, следует помнить о некоторой условности. Принимая все это во внимание, термин вязкость часто заменяют термином кажущаяся вязкость, означающим свойство, проявляющееся в виде вязкости. Методы измерения внутриклеточной вязкости условно разделяют на две категории: методы интегральной оценки и методы измерения в индивидуальных клетках.

Методы интегральной оценки внутриклеточной вязкости

Эти методы применяются к образцам, которые содержат относительно большую популяцию клеток, таким как клеточные суспензии, фрагменты тканей или органов. Это позволяет получить усредненные значения для исследуемой популяции. Вращательную диффузию флуоресцентных, ЭПР и ЯМР зондов анализируют путем измерения времени их вращательной корреляции, которое напрямую связано с вязкостью микроокружения:

$$\theta = 4\pi\eta r^3 / 3k_B T, \quad (5)$$

где θ – время вращательной корреляции, k_B – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, η – вязкость, r – радиус зонда.

Внутриклеточную вязкость можно определить флуориметрически, используя измерения анизотропии флуоресценции зондов a [15]. Этот подход основан на том, что анизотропия флуоресценции зависит от вращательной подвижности флуорофора и, следовательно, от вязкости. Оценку вязкости выполняют одним из двух способов: на основе время-разрешенной и стационарной анизотропии флуоресценции. В первом случае время вращательной корреляции (θ) получают из затухания анизотропии:

$$\ln a(t) = \ln a_0 - \frac{t}{\theta}, \quad (6)$$

где a – анизотропия, θ – время вращательной корреляции, t – время.

Для расчета вязкости используют уравнение (5).

Во втором случае измеряют стационарную анизотропию при условии, что время жизни τ возбужденного состояния зонда постоянно:

$$\frac{1}{a} = \frac{1}{a_0} + \frac{\tau RT}{a_0 \eta V} \quad (7)$$

где a – анизотропия, τ – время жизни возбужденного состояния, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура, η – вязкость, V – объем молекулы зонда.

Известно использование флуоресцеина и азидофлуоресцеина в качестве зондов вязкости. Гидрофобные этерифицированные производные этих флуорофоров используются для проникновения в клетки через биомембраны. После проникновения в клетку сложные эфиры расщепляются эстеразами с образованием соответствующих гидрофильных флуорофоров [1].

С помощью ЯМР разработано несколько подходов к оценке диффузионных свойств внутриклеточной среды. Возможность проводить неинвазивные измерения и использовать определенные внутриклеточные молекулы в качестве «зондов» обеспечивает основные преимущества этого метода. Например, было обнаружено, что проксимальные остатки гистидина в молекулах гемоглобина и миоглобина имеют хорошо разрешенную полосу поглощения в спектрах ЯМР ^1H этих белков. Это позволяет измерять время вращательной корреляции миоглобина и гемоглобина как в растворе, так и в клетках. Другая группа природных ЯМР-зондов включает молекулы АТФ и фосфокреатина. Их спектры ЯМР ^{31}P хорошо разрешаются в растворах и в нативных биологических образцах [16]. Это послужило основой для разработки методов оценки подвижности молекул, содержащих фосфор. Особый интерес представляют методики, позволяющие детектировать «невидимые» для ЯМР внутриклеточные вещества путем введения в их структуру атомов, ядра которых имеют хорошо разрешенные спектры ЯМР, таких как, например, ^{13}C .

В таблице 1.1 представлены примеры использования упомянутых выше методов интегральной оценки внутриклеточной вязкости [1].

Методы оценки вязкости в индивидуальных клетках

Методы этой категории основаны на измерениях оптической плотности или различных характеристик флуоресценции специальных молекул – зондов. Флуоресценцию измеряют с помощью микрофлуориметрии [17] или микроскопии в сочетании с компьютерным анализом изображений [18]. В случае измерения оптической плотности используется микроспектрофотометрия [19].

В большинстве случаев для введения молекулярных зондов в клетки требуются специальные методики. Одним из подходов к получению относительно небольших гидрофильных флуорофоров является их этерификация с целью придания им гидрофобности, как это уже было описано выше. Введение более крупных молекул, таких как декстраны и фикоиллы различных масс [20] или белков, меченных флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) или флуоресцеином, [19] осуществляется путем микроинъекций. Существует также методика введения белков-зондов в клетки млекопитающих в культуре путем их слияния с тениями эритроцитов, нагруженными этими белками (см. обзор методов микроинъекций [21]).

Таблица 1.1 – Применение методов оценки интегральной внутриклеточной вязкости

№	Метод	Объект исследования	Полученный результат
1	Электронный парамагнитный резонанс	а) Цитоплазма клеток млекопитающих (клеточных культур) и конидий некоторых грибов	Вязкость – 2-5 сП
		б) Клеточная линия фибробластов Swiss 3T3	По вращательной и поступательной диффузии были получены схожие значения вязкости (2-3 сП). В условиях гипертонии поступательная подвижность зонда была снижена на 67%, в то время как вращательная на 20%, что говорит о наличии диффузионных барьеров в цитоплазме.
		в) Аскоспоры грибов <i>Talaromyces macrosporus</i>	Вязкость около 15 сП. При прорастании спор – снижение до 2-3 сП, что характерно для конидий.
		г) Цитоплазма клеток легких китайского хомяка и диатомовых водорослей при осмотическом стрессе, бактерии <i>Mycobacterium tuberculosis</i> при обработке изониазидом, конидии грибов <i>Neurospora crassa</i> при голодании и смерти	Существенные изменения подвижности спиновых зондов в стрессовых условиях.
2	Анизотропия флуоресценции зондов	а) Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Вязкость – 14 и 10 сП при 15 и 27 °С соответственно.
		б) Одноклеточные водоросли <i>Euglena gracilis</i>	Внутриклеточная вязкость составила 6 и 5 сП при 15 и 27 °С соответственно.
		в) Лимфоциты и тромбоциты	Изменение внутриклеточной вязкости при активации лимфоцитов и тромбоцитов.
		г) Клетки рака шейки матки	Зависимость внутриклеточной вязкости культуры клеток от осмотического давления среды.

Продолжение таблицы 1.1

№	Метод	Объект исследования	Полученный результат
3	Ядерный магнитный резонанс	а) Миоглобин в жидкой фазе миоцитов, в перфузируемом сердце крысы	Вязкость – около 1,5 сП
		б) Гемоглобин в эритроцитах	Вязкость – около 2,5 сП
		в) Клетки мышц задней конечности крысы	Коэффициент диффузии АТФ и фосфокреатина меньше, чем в буферных растворах, на 5 и ~14% соответственно.
		г) Мышечные волокна	Пространственная анизотропия диффузии фосфокреатина: коэффициент диффузии в продольном направлении волокон больше, чем в поперечном.
		д) Эритроциты человека	Вязкость внутри эритроцитов вдвое выше, чем в воде.

В частности, этот метод был использован для доставки меченого флуоресцеином иммуноглобулина G и бычьего сывороточного альбумина в клетки культуры фибробластов человека. Для изучения внутриклеточной диффузии и вязкости была разработана методика создания внутриклеточных гибридных (химерных) белков, содержащих зеленый флуоресцентный белок (GFP) [22]. Относительно недавно был разработан подход к изучению вязкости и/или диффузионных свойств внутриклеточной среды для крупномолекулярных зондов. Он основан на восстановлении флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP) флуоресцентного зонда. Кратковременной вспышкой мощного лазера зонд фотообесцвечивают на небольшом участке ячейки. После этого регистрируют восстановление флуоресценции в той же области, которое является результатом диффузии зонда. Динамика этого процесса отражает трансляционную диффузию молекул зонда во внутриклеточной среде (см. обзор [22]). Этот подход был успешно применен ко многим типам клеток, от относительно крупных мышечных клеток, до бактерий *Escherichia coli* и органелл.

Была разработана методика изучения вязкости цитоплазмы в клеточных культурах линий CV1 и PtK1 с использованием двух гомологичных индоцианиновых красителей Cy3.18 и Cy5.18, присоединенных к фикоλλу [20]. Метод основан на том факте, что квантовый выход флуоресценции этих зондов в разной степени зависит от вязкости. Измерение отношения интенсивности флуоресценции зондов в клетках позволяет оценить вязкость цитоплазмы.

В таблице 1.2 представлены примеры использования упомянутых выше методов оценки внутриклеточной вязкости в индивидуальных клетках [1].

Моделирование вязкости микроокружения ферментов in vitro

Внутриклеточная среда состоит как из низкомолекулярных растворенных веществ, так и из макромолекул, которые оказывают различное влияние на процесс диффузии. Низкомолекулярные вещества способны вызывать эффект микровязкости, который изменяют скорость диффузии. Макромолекулы могут влиять на диффузию путём столкновений, а также создавать эффект исключенного объема, который ускоряет диффузионно-контролируемые процессы. Изучение микровязкости в контексте биологии в значительной степени опирается на редукционистские биохимические подходы [23]. В экспериментах *in vitro* вязкость среды для биохимических реакций варьируют добавлением соразтворителей. Такие вещества как сахароза [24], глицерин [25], глюкоза [26], сорбитол [27], фиколл [28] и трегалоза [29] повышают вязкость раствора, в то время как метанол [30] её понижает. При этом возникает следующая методологическая проблема: добавляемые соразтворители неизбежно изменяют другие физико-химические свойства растворов, а также могут напрямую взаимодействовать с ферментами [23]. В связи с этим, исследование влияния именно вязкости на кинетические параметры ферментативных реакций требует тщательного отбора и использования нескольких модельных соразтворителей.

Для моделирования условий повышенной вязкости при изучении ферментативных процессов обычно используют вязкость в диапазоне от 1 до 4 сП. Считается, что этот диапазон достаточный для значимой интерпретации результатов, хотя в некоторых работах используются меньшие или большие значения вязкости [31]. Также, как упоминалось выше, важно понимать различие между микровязкостью и макровязкостью, заключающееся в следующем. *Макровязкость* – объемное свойство, измеряемое с помощью вискозиметра, оно описывает распространение импульса внутри жидкости в макроскопическом масштабе длины. *Микровязкость* описывает сопротивление, с которым сталкивается объект молекулярного размера, движущийся через жидкость. Микровязкость и макровязкость не обязательно равны: хотя можно легко увеличить макровязкость воды, например, добавляя растворимые полимеры, такие добавки существенно не влияют на скорость диффузии малых молекул в жидкости [32]. Различие между микровязкостью и макровязкостью является принципиальным для динамики белка. Например, низкомолекулярные соразтворители, такие как глицерин и сахароза, замедляют скорость катализа триозефосфатизомеразы, в то время как полимеры (полиэтиленгликоль, полиакриламид, фиколл) практически не оказывают такого эффекта [33].

В литературе неоднократно обсуждалась сильная обратная корреляцию между молекулярной массой повышающего вязкость соразтворителя и его эффективностью в замедлении микроскопической динамики различных процессов, таких как, например, диффузионное высвобождение лигандов, конформационная релаксация белка и рефолдинг белка.

Таблица 1.2 – Применение методов оценки внутриклеточной вязкости в индивидуальных клетках

№	Метод	Объект исследования	Полученный результат
1	Время вращательной корреляции по анизотропии флуоресценции низкомолекулярных зондов	а) Клеточные линии млекопитающих и растений, зонды 2,7-бис(2-карбоксиэтил)-5(6)карбоксифлуоресцеин (BCECF), 6-карбоксифлуоресцеин (6CF), 8-гидроксипирен-1,3,6-трисульфат и сульфородамин В	Вязкость цитоплазмы – 1,1-1,5 сП
		б) Цитоплазма яиц морского ежа, измеренная при помощи BCECF и 6CF	Вязкость цитоплазмы – 2,0-2,5 сП
		в) Эпителиальные клетки MDCK и фибробласты Swiss 3T3, молекулярные ротаторы BCECF и 6CF	Вязкость: по стационарной анизотропии – 10-13 сП; по время-разрешенной анизотропии – около 1,3 сП.
		г) Миоциты эмбриональной культуры клеток аорты крысы DB1X, зонд 4-[4-(диметиламино)стирил] пиридин (возбуждение на длинах волн 469 и 360 нм)	Вязкость цитоплазмы – 7-18 сП, пространственное распределение вязкости неравномерно.
2	Восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP)	а) Культура клеток фибробластов	Коэффициенты трансляционной диффузии IgG и БСА, меченных флуоресцеином, в ~70 раз меньше в клетках, чем в буфере. Также было замечено, что скорость диффузии исследуемых белков значительно увеличивалась после разрушения микротрубочек колхицином. Ограниченная подвижность белковых молекул в цитоплазме может быть обусловлена не только микровязкостью водной фазы, но и столкновениями со структурными элементами (супрамолекулярными комплексами и/или органеллами).

Продолжение таблицы 1.2

№	Метод	Объект исследования	Полученный результат
2	Восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP)	б) Клеточные культуры линий CV1 и PtK1, зонды Cy3.18 и Cy5.18, присоединенных к фикоλλу	Вязкость – 0,75 сП при 37 °С, одинаковая во всех исследованных областях клеток.
		в) Ядра и цитоплазма эпителиальных клеток MDCK и фибробластов Swiss 3T3, зонды – меченные FITC декстраны и фикоλλы различной молекулярной массы	Коэффициенты диффузии различных зондов в ядре и в цитоплазме примерно равны и в 4-5 раз ниже, чем в воде.
3	Комбинация метода FRAP с введением в клетки белка, меченого GFP	а) Эндоплазматический ретикулум клеточной культуры CHO K1	Скорость диффузии зонда в 9-18 раз ниже, чем в воде, и в 3-6 раз ниже, чем в цитоплазме.
4	Флуоресценция отдельных молекул для изучения диффузионных свойств цитоплазмы	а) Динамика мРНК, меченной GFP, в клетках <i>Escherichia coli</i>	Движение носит “субдиффузионный” характер, что может объясняться препятствиями, создаваемыми супрамолекулярными комплексами.
5	Широкопольная поляризационная флуоресцентная микроскопия, компьютерный анализ изображений	а) Вакуоль в дрожжах <i>S. cerevisiae</i> , зонд кинакрин	Вязкость – 3,5-14,1 сП. Наиболее часто встречаются клетки с вязкостью 5-6 сП.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при заданном значении макровязкости крупные полимерные сорастворители (например, декстран или полиэтиленгликоль) меньше взаимодействуют с поверхностью белка, чем мелкие сорастворители, такие как глицерин или этиленгликоль [34]. Однако вещества с более низким молекулярным весом (глюкоза, глицерин, этиленгликоль и т.д.) действительно влияют на микровязкость, и поэтому они предпочтительны для изучения роли трения в белковых реакциях [32].

1.2 Анализ влияния вязкости среды на биохимические процессы

1.2.1 Теория Крамерса

Теоретический анализ влияния вязкости на скорости химических реакций был впервые проведен Хендриком Крамерсом в 1940 году [35]. В его основополагающей статье была предложена теория скоростей химических реакций путем анализа динамики простого модельного процесса: частица, подверженная силам трения, преодолевает барьер потенциальной энергии за счет тепловых флуктуаций. Крамерс рассчитал скорость прохождения частицы через барьер в трех ситуациях: (1) слабое трение, когда частица переносится через барьер за счет своей инерции; (2) сильное трение, когда движение полностью диффузионное и инерция не важна; и (3) умеренное трение, когда определенную роль играют как инерция, так и диффузия. Полученная в результате теория скоростей является моделью для многих типов реакций, протекающих в присутствии трения, и она широко применяется к химическим реакциям в растворах, включая изомеризацию, туннелирование, реакции переноса атомов и переноса заряда [32]. Также теория Крамерса распространяется на многие другие случаи, включая многомерные поверхности свободной энергии, где одномерный барьер становится седловой точкой, и на частотно-зависимое трение (“трение с памятью”). Широко распространено мнение, что случай сильного трения Крамерса применим к конформационной динамике белков и реакциям сворачивания белков, поскольку динамика и низкочастотные колебания белков и пептидов очень сильно демпфируются вязкой средой в жидкой фазе. Детальное моделирование подтверждает, что динамика сворачивания является диффузионной, а не баллистической: фолдинг белка происходит в пределах сильного трения теории Крамерса [32].

Согласно литературным данным, вязкость клеточной цитоплазмы выше, чем чистой воды [36] и варьирует в зависимости от типа клеток (см. данные в Таблицах 1.1 и 1.2). Например, вязкость цитоплазмы *Saccharomyces cerevisiae* составляет около 10 сП [1]. Вязкость цитоплазмы значительно выше у организмов в состоянии покоя, а также при обезвоживании, осмотическом стрессе и тепловом шоке, так как тогда они накапливают низкомолекулярные соединения, такие как трегалоза, глицерин и др. Известно, что в клетке для функционирования многих ферментов важны конформационные переходы белковой глобулы. Флуктуация структуры белков связана с движением молекул воды в гидратной оболочке, а та, в свою очередь, с динамикой молекул, присутствующих в объеме раствора [29].

Трение между реагентами и растворителем изменяет вероятность преодоления активационного барьера и, следовательно, влияет на скорость реакции. Количественно этот эффект описывается уравнением:

$$k = \tau_{sx}^{-1} \exp(-\Delta U/RT), \quad (8)$$

где k – константа скорости превращения субстрата S в продукт P через промежуточный комплекс X ; ΔU – энергетический барьер (энергия активации); τ_{sx} – константа времени релаксации в отсутствие энергетического барьера активации; R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура [37].

τ_{sx} зависит от частоты нахождения молекулы в основном состоянии (S) и от частоты выхода из активированного состояния (X), что отражает подвижность субстрата в активированном состоянии. В растворе τ_{sx} пропорциональна коэффициенту трения γ , который, в свою очередь, связан с коэффициентом диффузии D и вязкостью η . Для сферических частиц это соотношение описывается уравнением:

$$\gamma = \frac{k_B T}{mD} = 6\pi\eta r/m, \quad (9)$$

где k_B – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, D – коэффициент диффузии, η – вязкость, m и r – масса и радиус частицы (молекулы) соответственно.

Таким образом, изучение связи между скоростью реакции и вязкостью среды позволяет установить роль диффузии в преодолении энергетического барьера реакции. Однако связь коэффициента трения с вязкостью может варьировать в зависимости от формы частиц и в случае реакций, катализируемых ферментами [1].

Применение теории Крамерса к ферментативным процессам

Известно, что многие ферментативные реакции *in vitro* зависят от вязкости среды [1]. Кинетика реакции в этом случае хорошо описывается теорией Крамерса, однако связь между константой скорости реакции и вязкостью является параметром, специфичным для фермента. В общем виде эту связь описывают уравнением [2]:

$$k \sim (\eta/\eta_0)^{-\beta}, \quad (10)$$

где k – константа скорости реакции, η и η_0 – вязкость раствора и растворителя соответственно, $0 < \beta < 1$ (для ферментов $\beta \approx 0,4-0,8$).

Дисахариды, такие как трегалоза, способствуют гидратации поверхности белка (предпочтительная гидратация), но также снижают динамику воды первого гидратного слоя. В результате движение аминокислотных остатков замедляется, а скорость структурных колебаний фермента становится зависимой от вязкости среды [29].

Для многих ферментов зависимость катализа от вязкости объясняют ингибированием флуктуаций белка по теории Крамерса [29, 38], описываемым уравнением:

$$k = \frac{A}{\eta} e^{-\frac{\Delta}{k_B T}}, \quad (11)$$

где Δ – высота потенциального барьера, k – константа скорости катализа (k_{cat}), A – функция структурных параметров, характеризующих профиль потенциальной энергии, k_B – постоянная Больцмана, η – вязкость среды.

Уравнение (12) является актуализированной версией уравнения (11) при использовании кинетического параметра фермента V_{max} ($V_{max} = k_{cat} \cdot [E_t]$).

$$V_{max} = \frac{A}{\eta} e^{-\frac{\Delta U}{RT}}, \quad (12)$$

где ΔU – высота потенциального барьера, R – газовая постоянная.

Примечательно, что уравнение (12) было эффективно использовано для анализа ингибирования ферментативного катализа в присутствии трегалозы. Это указывает на то, что трегалоза действительно ингибирует скорость катализа, препятствуя структурным колебаниям ферментов во время каталитического цикла. V_{max} становится обратно пропорциональной вязкости среды ($V_{max} \sim 1/\eta$), и при построении графика зависимости V_{max} от η^{-1} обычно наблюдается линейная зависимость [29]. Важно отметить, что вязкость, создаваемая трегалозой в растворе, будет влиять в основном на масштабные структурные движения, участвующие в катализе. Например, установлено, что H^+ -АТФаза растений линейно ингибируется вязкостью, создаваемой присутствием сахарозы, которая является природным дисахаридом растений [39]. Кроме того, кинетика восстановления пирувата лактатдегидрогеназой (ЛДГ) в мышцах кролика зависит от средней вязкости, поскольку катализ ЛДГ зависит от движения мобильной петли в активном центре. Как и ожидалось по теории Крамерса, V_{max} ЛДГ зависит от вязкости среды. Примечательно, что вязкость увеличивает энергию активации (E_a) обоих ферментов, H^+ -АТФазы и ЛДГ [40]. Таким образом, в общем случае, вязкость будет оказывать значительное воздействие на ферментативный катализ в том случае, когда в каталитический механизм вовлечено относительно большое структурное движение. Другими примерами ферментативных процессов, демонстрирующих вязкостную зависимость в соответствии с теорией Крамерса, являются уменьшение k_{cat} карбоангидразы, миозина и меромиозина, синтетазы жирных кислот (FAS), карбоксипептидазы-A (CPA), полимеразы β (POLB), фермента, расщепляющего олиго-1,6-глюкозидазы 1 (MalL), а также констант скорости реакций переноса электрона сульфитоксидазой (SO) [29]. При экстремальных значениях вязкости, т. е. в случаях, когда ферменты погружены в стеклообразную среду, где вязкость бесконечно высока, отсутствие движения белка приводит к остановке катализа [38]. Модуляция динамики белков/ферментов вязкостью также была недавно подтверждена вы-

числительными методами молекулярной динамики на примере небольшого белкового фактора и ssIGPS [41].

Повышающие вязкость растворенные вещества также влияют на константу Михаэлиса (K_M) фермента или на связывание и диссоциацию субстрата, когда в любой из этих процессов вовлечена структурная перестройка фермента. Например, глицерин увеличивает K_M фосфоорилазы В [25], трегалоза снижает K_M глюкозооксидазы (GOx) и глюкоамилазы из *Aspergillus niger* [29]. Таким образом, каталитическая эффективность (k_{cat}/K_M) ферментов изменяется по мере того, как сродство к субстрату уменьшается/увеличивается под действием соразтворителей, повышающих вязкость, препятствуя структурным движениям при связывании лиганда или при его диссоциации. Активация трегалозой была продемонстрирована для термофильных ферментов, таких как нейтральная глюкоамилаза плесени *Thermomucor indicaeseudaticae*. Точно так же для пируваткиназы *Geobacillus stearothermophilus* (кооперативный фермент) трегалоза увеличивает скорость ферментативной реакции за счет увеличения сродства к субстрату как в «напряженном», так и в «расслабленном» (Т и R соответственно) состояниях, и препятствуя заселению каталитически непродуктивных конформационных состояний. В основе этого явления (активации фермента) могут лежать различные механизмы: влияние вязкости на структурные флуктуации фермента (т. е. на переход $R \leftrightarrow T$), заселение определенного олигомерного состояния, уменьшение объема белка, которое приводит к образованию сайта связывания, предотвращение формирования каталитически непродуктивных конформаций фермента, или комбинация перечисленных механизмов. Также наблюдали «сжимающий» эффект соразтворителей, создающих вязкость, таких как глицерин, сахароза и трегалоза, на структуру белка. Например, объем лизоцима уменьшался примерно на 2% в присутствии трегалозы [37].

Отклонения от теории Крамерса

Большинство исследований зависимости скорости ферментативной реакции от вязкости среды обсуждают случаи, когда значение показателя степени δ в соотношении $k \sim \eta^\delta$ находится в диапазоне 0-1. Однако иногда показатель степени может выходить за пределы данного диапазона. Нетипичная степень замедления скорости процесса с ростом вязкости может быть объяснена рядом факторов, таких как характерные равновесные тепловые флуктуации [2] низкоамплитудные движения, необходимые для определенных функций белка, недостаточное сцепление реакционного центра с растворителем, и аномальное внутреннее трение [42].

В работе [42] описаны три процесса, скорость которых замедлялась с ростом вязкости (моделируемой глицерином) с показателем степени $\delta > 1$: разворачивание цитохрома С, катализируемое рибосомным белком S4 человека, расщепление пептида и термоиндуцированная диссоциация связанного с гемом СО из нативного цитохрома С. Замедление данных процессов с

ростом вязкости, превышающее предсказанное теорией Крамерса, представляет интерес, поскольку оно предполагает наличие дополнительных степеней свободы как для растворенного вещества, так и для растворителя по сравнению с числом степеней свободы, создаваемым диффузионными флуктуациями. Для всех трех изученных процессов показатель степени вязкости δ по крайней мере в 2 раза превышал единицу, что является нетривиальным результатом, поскольку ни феноменологические объяснения данных, ни Теория Грота-Хайнса не допускают случая $\delta > 1$ [52].

Применение теории Крамерса к изучению термоинактивации ферментов

Известно, что количество конформационных состояний, доступных для белка, связано с окружающей температурой [43]. При повышении температуры амплитуда и частота структурных флуктуаций критически увеличиваются вплоть до разворачивания/денатурации белка, а в денатурированном состоянии количество возможных конформаций становится огромным. Первое, что происходит с ферментом при разворачивании – это потеря каталитической активности. Было высказано предположение, что высокая вязкость стабилизирует белки, вызывая преимущественную гидратацию их поверхности, сохраняя гидратную оболочку и уменьшая ее динамику, тем самым препятствуя движениям белка, ведущим к разворачиванию [29]. Термостабилизацию в средах с высокой вязкостью наблюдали для различных ферментов. Например, было показано, что люцифераза *Renilla reniformis* стабилизируется трегалозой за счет ингибирования структурных флуктуаций, генерируемых высокой температурой. В то же время, замедление термической инактивации глюкоамилазы *A. niger* и α -амилазы *Bacillus* в присутствии трегалозы происходило за счет ослабления внутрибелковых гидрофобных взаимодействий, что препятствовало агрегации белка. Для некоторых ферментов была детально исследована кинетика термоинактивации первого порядка в присутствии соразтворителей, повышающих вязкость [29]. Кинетический анализ показал, что в вязких средах снижается константа скорости термоинактивации (k_{in}) ксантиноксидазы *Arthrobacter* M3, пируваткиназы из мышц кролика, глюкоамилазы *A. niger* и грибной тирозиназы *Agaricus bisporus*. Термоинактивация H^+ -АТФазы плазматической мембраны дрожжей *Kluyveromyces lactis* демонстрирует двухфазную кинетику и присутствие активного промежуточного интермедиата ($N \rightarrow I \rightarrow U$) (Рисунок 1.1, в) с соответствующими константами скорости для каждой стадии k_{in1} и k_{in2} . Было получено, что физиологические концентрации трегалозы стабилизируют H^+ -АТФазу, уменьшая как k_{in1} так и k_{in2} : эти константы оказались обратно пропорциональны вязкости среды ($k_{in} \sim \eta^{-1}$), в соответствии с теорией Крамерса и уравнением (11) [29].

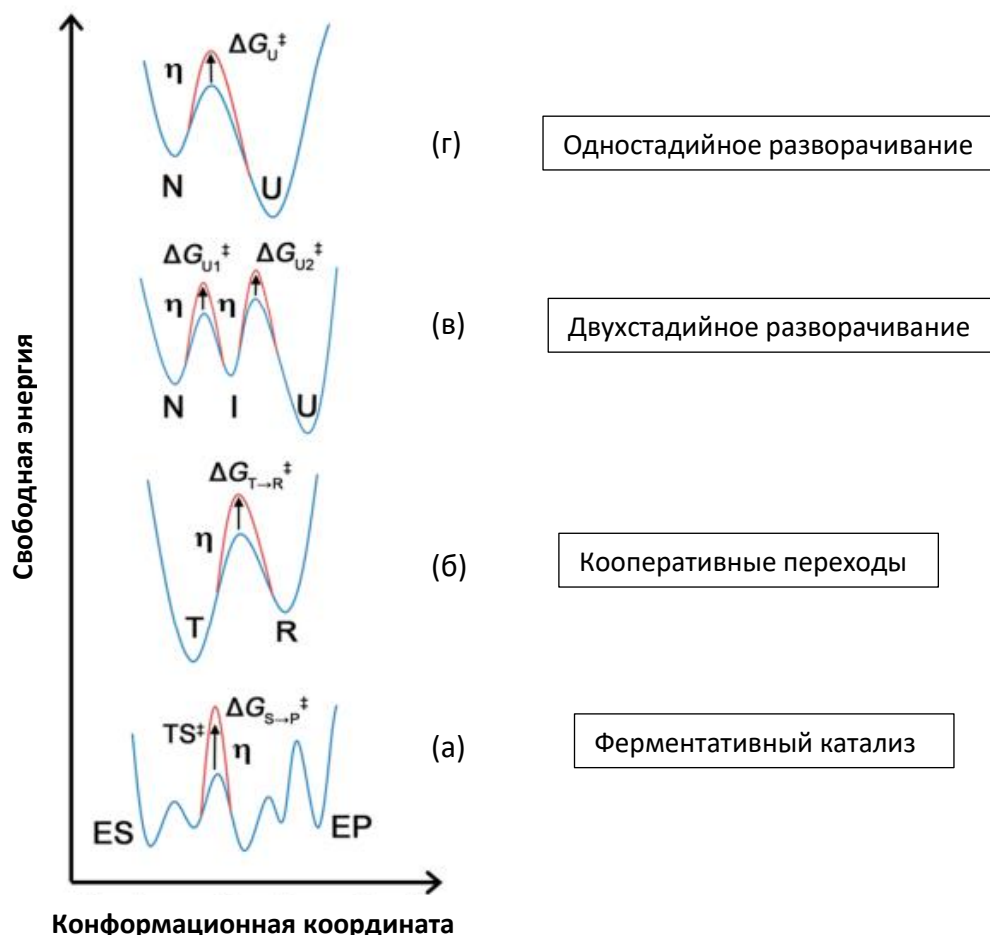


Рисунок 1.1 – Энергетический ландшафт диффузионно-зависимых белковых процессов [29]. Высокая средняя вязкость (η) увеличивает значение свободной энергии (красная линия) взаимопревращений между конформационными состояниями в белках (синяя линия): (а) конформационные состояния при ферментативном катализе, (б) конформационное равновесие между состояниями Т и R кооперативного фермента, (в) двухстадийное разворачивание белка ($N \leftrightarrow I \leftrightarrow U$), (г) одностадийное разворачивание белка ($N \leftrightarrow U$).

Анализ констант скорости термоинактивации α -амилазы, H^+ -АТФазы [44] и глюкозооксидазы *A. niger* в вязких средах показал, что соразтворители увеличивают энергию активации (E_a) этого процесса [29]. В частности, для глюкозооксидазы, чей катализ зависит от присутствия в активном центре кофермента FAD, термоинаktivация проходит сначала путем образования расплавленной глобулы фермента, а затем через высвобождение FAD. Это приводит к необратимой потере активности. Был описан следующий механизм стабилизирующего действия трегалозы: она снижает константу скорости термически генерируемых масштабных структурных флуктуаций, тем самым предотвращая образование расплавленной глобулы. Как следствие, замедляется высвобождение FAD, константа скорости инактивации глюкозооксидазы снижается,

$T_{1/2}$ высвобождения FAD увеличивается до более высоких значений. В этом механизме разворачивания трегалоза, предположительно, действует, уплотняя белковую структуру фермента. Аналогичный механизм стабилизации трегалозой наблюдали для термоинактивации орнитин-транскарбамилазы [29].

Зависимость скорости разворачивания белка от вязкости среды в присутствии трегалозы наблюдали в цитохроме С, фосфолипидкиназе, β -лактоглобулине. Как и при термоинактивации, трегалоза снижает константу скорости термоденатурации, способствуя компактности развернутого состояния через торможение крупномасштабных структурных флуктуаций [29]. Что касается обратного процесса – фолдинга белка, считается, что высокая вязкость влияет на скорость сворачивания, подавляя структурную динамику, как описано в теории Крамерса [32].

Механизмы влияния низкомолекулярных соединений, повышающих вязкость раствора, таких как дисахариды, на структурную стабильность белков часто обсуждаются в терминах межмолекулярных взаимодействий в парах белок-вода, соразтворитель-вода, белок-соразтворитель. Известно, что вода является средой, в которой происходит большинство биохимических процессов, и вода первого гидратного слоя играет фундаментальную роль в поддержании структуры и функции белков. При этом динамика воды первого гидратного слоя белка отличается от динамики свободных молекул воды [45].

Дисахариды в растворе имеют относительно жесткую конформацию и совершают медленное поступательное движение (самодиффузия). Молекулы дисахаридов образуют более сильные водородные связи друг с другом, чем с молекулами воды [46]. Это, видимо, облегчает витрификацию, т. е. позволяет молекулам воды покинуть систему. Кроме того, дисахариды нередко исключаются с белковых поверхностей, что приводит к предпочтительной гидратации [47]. Однако, кроме этого трегалоза, судя по всему, замедляет динамику воды гидратной оболочки белков, и, как следствие, динамику их аминокислотных остатков. Например, для С-фикоцианина было получено, что трегалоза замедляет динамику воды гидратной оболочки на порядок по сравнению с динамикой объемной воды. В результате белковые процессы, в которых структурная динамика является основным компонентом, зависят от присутствия трегалозы в среде. В частности, это фолдинг, разворачивание, термоинактивация, олигомеризация, агрегация, катализ и даже равновесие между каталитическими состояниями (Рисунок 1.1). Термодинамический эффект повышенной вязкости заключается в увеличении энергетического барьера между различными структурными состояниями (Рисунок 1.1) [29].

1.2.2 Кинетический эффект вязкости растворителя

Метод кинетического эффекта вязкости растворителя (КЭВР, в англоязычной литературе KVSE) называют эффективным, но недооцененным методом исследования механизма функционирования ферментов в целом [31]. Он может предоставить ценную информацию о биохимическом процессе, дополняя данные, полученные другими кинетическими методами (например, стационарной и нестационарной кинетики, изотопным и т.д.). КЭВР использует тот факт, что для того, чтобы в ферментативных реакциях происходил химический процесс (за исключением реакций переноса электрона), субстрат должен сначала обратимо связываться с ферментом с образованием фермент-субстратного комплекса (k_1). Комплекс фермент-субстрат затем превращается в комплекс фермент-продукт через химическую стадию катализа (k_3) с последующим выделением продукта реакции из активного центра фермента (k_5) (Рисунок 1.2).



Рисунок 1.2 – Кинетический механизм реакции фермента E с одним субстратом S и продуктом P, включающий стадии связывания субстрата (k_1) и его диссоциации (k_2), обратимого катализа (k_3 и k_4) и высвобождением продукта (k_5).

В такой системе движение как фермента, так и субстрата в растворе отвечает основным принципам молекулярной диффузии. Константа скорости второго порядка для первой стадии (k_1 на рисунке 1.2, $M^{-1}s^{-1}$), может быть представлена уравнением Смолуховского:

$$k_1 = 4\pi N_A r_0 (D_A + D_B), \quad (13)$$

где N_A – постоянная Авогадро, $D_A + D_B$ – сумма коэффициентов диффузии двух молекул и r_0 – сумма радиусов двух взаимодействующих молекул.

Коэффициент диффузии D_i , как следует из уравнения Стокса-Эйнштейна для сферических частиц с радиусом r_i (4), обратно пропорционален силе трения, испытываемой частицей в растворе, которая, в свою очередь, зависит от вязкости растворителя.

Когда две маленькие молекулы имеют одинаковый размер, значение k_1 составляет примерно 10^9 - $10^{10} M^{-1}s^{-1}$ в воде при физиологических температурах. Это значение представляет собой верхний предел для диффузионно контролируемых реакций. Поскольку ферменты и субстраты представляют собой большие молекулы, их диффузия медленнее, и верхние предельные значения для диффузионно-лимитируемых ферментативных реакций обычно находятся в диапазоне 10^8 - $10^9 M^{-1}s^{-1}$ или даже ниже. Ноулз ввел термин «эволюционно совершенных фермен-

тов» для белков, которые катализируют реакции со значениями k_{cat}/K_M 10^9 - 10^{10} $M^{-1}s^{-1}$ [47]. В эволюционно совершенных ферментах химические стадии катализа (k_3 на рисунке 1.2, s^{-1}) протекают намного быстрее, чем взаимодействие между ферментом и субстратом (k_1 и k_2 на рисунке 1.2, $M^{-1}s^{-1}$ и s^{-1} соответственно); в таком случае, можно утверждать, что реакция контролируется диффузией. Аналогичным образом, высвобождение продуктов из активного центра фермента (k_5 на рисунке 1.2, s^{-1}) может определять скорость общего оборота фермента, когда химическая стадия катализа намного быстрее, чем высвобождение продукта. Подход КЭВР заключается в определении, являются ли ферментативные реакции контролируемыми диффузией. Хотя тип информации, которую можно получить с помощью КЭВР, также может быть доступен при использовании других подходов, считается, что этот метод дает преимущество легкости выполнения и интерпретации и не требует специализированных дорогих приборов [31].

В исследованиях КЭВР наиболее часто используют такие параметры стационарной кинетики как k_{cat}/K_M и k_{cat} , потому что информацию о стадиях связывания субстрата и высвобождения продукта легко получить с помощью других экспериментальных методов. Для реакции, представленной на рисунке 1.2, аналитическое определение k_{cat} дается уравнением (14), а k_{cat}/K_M – уравнением (15). Оба уравнения упрощаются до уравнений (16) и (17), если химическая стадия катализа необратима, т. е. $k_4 \approx 0$ или $k_5 \gg k_4$.

$$k_{cat} = \frac{k_3 k_5}{k_3 + k_4 + k_5} \quad (14)$$

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_1 k_3 k_5}{k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_3 k_5} \quad (15)$$

$$k_{cat} = \frac{k_3 k_5}{k_3 + k_5} \quad (16)$$

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_1 k_3}{k_2 + k_3} \quad (17)$$

Таким образом, помимо информации о химической стадии катализа, k_{cat} может сообщить о стадии высвобождения продукта из комплекса фермент-продукт (k_5), а из соотношения k_{cat}/K_M можно сделать вывод о стадии ассоциации субстрата (k_1) и диссоциации субстрата из фермент-субстратного комплекса (k_2). Другие кинетические подходы также могут быть использованы для измерения КЭВР (такие как метод нестационарной кинетики или стационарной кинетики для ферментов с несколькими субстратами) при условии, что механистическая информация

(например, константа диссоциации) может быть извлечена для анализа из регистрируемых кинетических параметров.

При изучении КЭВР кинетические параметры ферментативной реакции обычно получают в буферных растворах с добавлением глюкозы, сахарозы или глицерина. Отношение вязкости среды, содержащей соразтворитель, к вязкости растворителя (буфера) называют относительной вязкостью раствора (η_{rel}). Для изучения КЭВР также важно использовать вязкие агенты различной химической природы, чтобы исключить возможность их специфического влияния на активность фермента. Нормированный кинетический параметр получают как отношение значения кинетического параметра в отсутствие соразтворителя $(k)_0$, к его значению в присутствии соразтворителя $(k)_\eta$. Данные представляют в виде зависимости интересующего нормированного кинетического параметра, например $(k_{cat})_0/(k_{cat})_\eta$ или $(k_{cat}/K_M)_0/(k_{cat}/K_M)_\eta$ от относительной вязкости η_{rel} .

Зачастую зависимость носит линейный характер:

$$\frac{(k)_0}{(k)_\eta} = m(\eta_{rel} - 1) + 1. \quad (18)$$

В ряде случаев это соотношение может значительно отличаться от линейной и демонстрировать обратную гиперболическую зависимость:

$$\frac{(k)_0}{(k)_\eta} = \frac{1}{1 + A[\frac{\eta_{rel}-1}{(\eta_{rel}-1)+B}]}. \quad (19)$$

Важно отметить, что изучение КЭВР не дает информации о том, является ли химическая стадия катализа в ферментативной реакции обратимой или необратимой. Однако использование подхода КЭВР при исследовании стадий связывания субстрата и высвобождения продукта позволяет сделать выводы о том, контролируется ли ферментативная реакция диффузией субстрата, высвобождением продукта или химической стадией катализа, независимо от её обратимости. Аналогично, определение наличия внутренней изомеризации комплекса фермент-субстрат или фермент-продукт не требует знания о том, является ли каталитическая стадия в ферментативной реакции обратимой [31].

Обратная гиперболическая зависимость $(k_{cat})_0/(k_{cat})_\eta$ или $(k_{cat}/K_M)_0/(k_{cat}/K_M)_\eta$ от η_{rel} свидетельствует о наличии стадии внутренней изомеризации в комплексе фермент-субстрат или фермент-продукт, чувствительной к вязкости растворителя (Рисунок 1.3).

В некоторых случаях обратная линейная зависимость $(k_{cat})_0/(k_{cat})_\eta$ или $(k_{cat}/K_M)_0/(k_{cat}/K_M)_\eta$ от η_{rel} наблюдается, если внутреннее равновесие между ферментными комплексами нарушается при очень высоких концентрациях соразтворителя. В обоих случаях диффузионные процессы молекул, которые приводят к образованию или распаду комплексов фермент-субстрат и фермент-продукт, действительно исключаются, поскольку в этом случае теория предсказывает ли-

нейную зависимость с наклоном между 0 и 1.

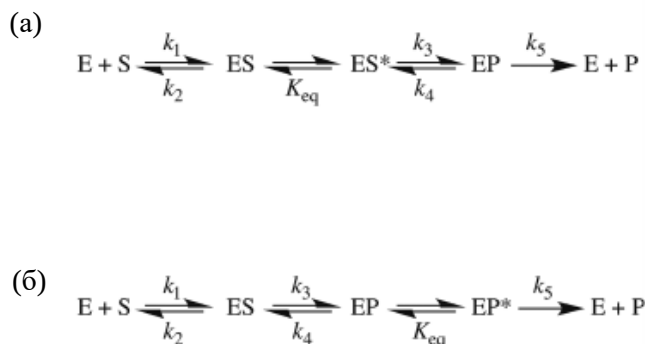


Рисунок 1.3 – Кинетический механизм фермента E с одним субстратом S и продуктом P при наличии стадии внутренней изомеризации фермент-субстратного комплекса (а) или комплекса фермент-продукт (б).

Гиперболическая зависимость, напротив, является признаком внутреннего равновесия ферментного комплекса, которое нарушается присутствием повышающего вязкость соразтворителя. При обратной гиперболической зависимости присутствие соразтворителя будет благоприятствовать протеканию дальнейших каталитических стадий, вовлеченных во внутреннее равновесие, поскольку интересующий кинетический параметр имеет большее значение в присутствии вязкого агента, чем в отсутствие. Зная механизм стационарной кинетики фермента, можно установить, происходит ли внутренняя изомеризация с комплексом фермент-субстрат или фермент-продукт. Например, наблюдение обратной гиперболической зависимости k_{cat} , или k_{cat}/K_M от вязкости для фермента, катализирующего необратимую реакцию, согласуется с изомеризацией комплекса фермент-субстрат, но не комплекса фермент-продукт [31].

Как было сказано выше, вязкость водных растворов может быть увеличена путем добавления различных соразтворителей, причем наиболее эффективными являются полигидроксилированные соединения. Также важно снова отметить значительное различие между микровязкостью и макровязкостью раствора. Микровязкость определяется как сопротивление движению молекулы в растворе и является соответствующим физико-химическим параметром в уравнении Стокса-Эйнштейна (4). Макровязкость растворителя определяет свободный объем, доступный для молекулы, движущейся в растворе [48]. Исследуя КЭВР, для увеличения микровязкости растворителя обычно используют относительно небольшие добавки, такие как глицерин, глюкоза или сахароза. С другой стороны, для увеличения макровязкости, как правило, используются полимерные добавки, такие как фикоилл или полиэтиленгликоль (PEG) [48]. Они могут быть использованы в качестве контроля для КЭВР, чтобы однозначно показать, что наблюдаемый эффект вязкости растворителя обусловлен диффузионными процессами, а не эффектами

краудинга. В ряде работ было показано, что добавки с высокой молекулярной массой в меньшей степени снижают каталитическую эффективность ферментов, замедляют диффузию лигандов и процессы фолдинга белков [31].

Используя подход КЭВР, для некоторых ферментов были показаны такие кинетические особенности функционирования:

1) Диффузионно-зависимое связывание субстрата

Было исследовано связывание пептидных субстратов химотрипсином в присутствии фикола и сахарозы [49]. Вязкостные зависимости анализировали для субстратов с п-нитрофениловым и метиловым эфирами ($k_{cat}/K_M \sim 10^7$ и $10^5 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ соответственно) и «плохого» субстрата п-нитроанилина ($k_{cat}/K_M \sim 300 \text{ мМ}^{-1}\text{с}^{-1}$). Для всех трех пептидных субстратов не наблюдалось каких-либо серьезных эффектов в присутствии фикола. В средах с сахарозой получили, что константа скорости ацилирования частично ограничена диффузией пептидов с п-нитрофениловым эфиром и в меньшей степени – с метиловым. Значение k_{cat}/K_M для «плохого» субстрата было нечувствительным к вязкости раствора. Использование «плохих» субстратов помогло определить, связано ли наблюдаемое влияние вязкости с другим этапом каталитического цикла. Аналогично, отсутствие влияния эффекта исключенного объема на k_{cat}/K_M подтвердило, что наблюдаемый эффект вызван изменением диффузии субстрата, а не воздействием на другую кинетическую стадию.

Реакция, катализируемая триозофосфатизомеразой была изучена в средах с фиконом, полиэтиленгликолем и полиакриламидом, а также глицерином. В качестве контроля была также использована мутантная форма фермента, для которой химическая стадия была скоростью-лимитирующей. Было получено, что связывание субстрата с ферментом ограничено диффузией, и что фермент представляет собой «эволюционно совершенный фермент», который не может быть улучшен с точки зрения повышения его каталитической эффективности [48].

2) Лимитирующая стадия высвобождения продукта

Сахароза и глицерин были использованы в качестве вязких агентов для изучения цАМФ-зависимых протеинкиназ методом КЭВР. Было получено, что значения k_{cat} для нескольких пептидов чувствительны к вязкости раствора и демонстрируют линейную зависимость от вязкости с тангенсом наклона, близким к единице. Это позволяет предположить, что высвобождение продукта является лимитирующей стадией в каталитическом цикле.

Кинетика человеческой С-терминальной Src киназы (Csk) была изучена в присутствии сахарозы в качестве повышающего вязкость соразтворителя и полиэтиленгликоля (PEG 8000) в качестве краудинг-агента [50]. Была получена линейная зависимость k_{cat} от вязкости с тангенсом угла наклона 0,42, что позволяет предположить, что высвобождение АДФ частично ограничивает скорость общего оборота фермента.

Существует несколько других публикаций, сообщающих об использовании КЭВР для исследования высвобождения продукта реакции, в некоторых из которых была установлена прямая связь между лимитирующей стадией высвобождения продукта и конформационными изменениями фермента [31].

3) Лимитирующая стадия изомеризации фермента

Измеряя влияние вязкости растворителя на значения k_{cat}/K_M или k_{cat} , можно установить наличие внутренней изомеризации комплексов фермент-субстрат или фермент-продукт. Метод КЭВР был применен для изучения малатдегидрогеназы *Ascaris sum* [51]. При использовании глицерина для повышения вязкости значение $(k_{cat}/K_M)_0/(k_{cat}/K_M)_\eta$ уменьшилось до 0,6 в присутствии 9% глицерина и до 0,2 в присутствии 18% глицерина. Точно так же отношение $(k_{cat})_0/(k_{cat})_\eta$ приняло значения 0,8 для 9% глицерина и 0,5 для 18% глицерина. Отсутствие аналогичных эффектов в контрольных экспериментах с этанолом и фиколлом продемонстрировало, что именно изменения относительной вязкости растворителя, а не макровязкости или диэлектрической проницаемости, являются причиной изменений кинетических параметров. Был сделан вывод, что в условиях повышенной вязкости происходит изменения константы скорости изомеризации фермента, связанной с каталитическим процессом.

Обратная гиперболическая зависимость $(k_{cat}/K_M)_0/(k_{cat}/K_M)_\eta$ от вязкости наблюдалась для реакции кислорода с холиноксидазой, и тем было показано, что требуется изомеризация восстановленного фермента перед реакцией с кислородом [52].

1.2.3 Роль активности воды в эффектах соразтворителей на ферменты

Считается, что функционирование фермента сильно зависят от состояния воды в системе, которое, в свою очередь, зависит от присутствия соразтворителей. Как показатель состояния воды хорошо зарекомендовало себя понятие активности воды [53]. Экспериментально активность воды в растворе определяют как отношение парциального давления водяного пара в этом растворе к парциальному давлению водяного пара в стандартном растворе (чистой воде) [11].

Ранее было показано, что активность воды играет определяющую роль для положения равновесия гидролазной реакции в маловодных системах, для ферментативной активности пенициллинацилазы в растворах полимеров и солей. Было показано, что активность воды определяет энантиоселективность липазы, катализирующей этерификации ибупрофена в органических растворителях [53].

В то же время отмечается, что активность воды не является единственной детерминантой функции ферментов, поскольку присутствие соразтворителей обуславливает также вяз-

кость раствора, величину исключенного объема и т. д. Так, есть примеры исследований, где показано, что характер зависимости активности фермента в органических растворителях и степени его гидратации от активности воды различаются для разных типов растворителей [54].

В качестве показателя, характеризующего степень влияния растворённых молекул на активность воды, используют параметр α (он же константа Норриша k_N , он же параметр α уравнения Маргулеса). Он определяется следующим уравнением концентрационной зависимости коэффициента активности воды в присутствии растворенных молекул:

$$a_w = \gamma_w X_w, \quad (20)$$

$$\gamma_w = \exp(\alpha X_s^2 + \beta X_s^3), \quad (21)$$

где a_w и γ_w – активность и коэффициент активности воды соответственно, X_w – мольная доля воды, а X_s – мольная доля растворенного вещества.

Параметр α представляет собой отклонение состояния воды в растворах от состояния идеального раствора и считается мерой избыточной свободной энергии g^E , вызванной взаимодействием растворитель-растворенное вещество:

$$g^E = \alpha X_s X_w. \quad (22)$$

Много исследований было посвящено определению параметра α для различных химических соединений, как экспериментальными, так и теоретическими методами (см. для примера [55]). В [56] было доказано, что параметр α имеет хорошую корреляцию с параметрами, характеризующими степень упорядочения водных растворителей, о которых сообщалось ранее, такими как В-коэффициент вязкости для электролитов, параметр гидратации для неэлектролитов и число экваториальных ОН-групп для сахаров. Был сделан вывод, что параметр α является эффективным в качестве показателя упорядоченности водного растворителя [56]. Растворенное вещество с $\alpha < 0$ проявляет себя как стабилизирующее порядок водного растворителя, тогда как растворенное вещество с $\alpha > 0$ дестабилизирует порядок растворителя. Соединения, вызывающие беспорядок в биологических макромолекулах и надмолекулярных ансамблях называют *хаотропами*, в то время как соединения, оказывающие обратный эффект – *космотропами* [57]. Кроме того, было показано, что параметр α имеет хорошую корреляцию с движением молекул диполя воды в растворах неэлектролитов, измеренным методом диэлектрической релаксации [58].

Влияние активности воды на функционирование ферментов чаще всего рассматривают в свете эффекта, оказываемого на фермент-субстратные взаимодействия. Гидрофобные межмолекулярные взаимодействия могут быть ослаблены/усилены вследствие изменения активности воды в растворе. Известно, что *космотропы*, такие как сахара, снижают растворимость гидрофобных аминокислот, тогда как *хаотропы*, такие как мочевины, повышают растворимость этих аминокислот [59]. В работе [53] были измерены кинетические параметры алкогольдегидрогена-

зы дрожжей, лизоцима и β -галактозидазы в растворах с фиксированным a_w в присутствии различных соразтворителей, включая NaCl, KCl, CsCl, мочевины, рибозу, глюкозу, этиленгликоль, формамид, метанол, этанол, глюкозу, трет-бутиловый спирт и сахарозу. Во всех исследованных случаях наблюдали уменьшение K_M , то есть увеличение сродства фермента к субстрату с ростом упорядоченности растворителя, коррелирующее с параметром α . Растворенные вещества с $\alpha < 0$ стабилизируют порядок растворителя, что может усиливать гидрофобное взаимодействие, что приводит к усилению сродства фермента к субстрату и уменьшению K_M . Напротив, растворенное вещество с $\alpha > 0$ дестабилизирует порядок растворителя, и действует противоположным образом на фермент-субстратное взаимодействие.

Также было показано, что упорядочение растворителя влияет на термическую стабильность белка посредством усиления гидрофобных взаимодействий [60]. Упорядочивание растворителя также вызывало снижение молекулярно-каталитической активности α -химотрипсина А. Вероятно, наблюдаемый эффект был вызван уменьшением термических флуктуаций из-за структуризации растворителя. Данное предположение было высказано по изменению движения диполей воды, измеренному по времени диэлектрической релаксации при упорядочении растворителя [53].

1.2.4 Эффект исключенного объема и его влияние на биохимические процессы

Наличие локально высоких концентраций множества видов молекул внутри клетки приводит не только к повышению вязкости цитоплазмы, но и к так называемому эффекту краудинга («переполненности»). Оценка содержания в клетке таких макромолекул как белки, аминокислоты, рибонуклеопротеиды, полисахариды, и т.д. дает значение 80-400 мг/мл и, соответственно, они занимают 5%-40% от объема клеточного пространства, создавая при этом стесненное пространство с ограниченным количеством свободной воды [61]. Такую среду называют «переполненной» (англ. *crowded*), а не «концентрированной», поскольку, вообще говоря, ни один из присутствующих компонентов может не быть в высокой концентрации. Очевидно, что среднее расстояние между макромолекулами в таком переполненном окружении может быть гораздо меньше их собственного размера. Более того, объем, занятый растворенными молекулами, становится недоступным для других молекул. В результате, любые реакции, зависящие от доступного объема, могут быть чувствительны к эффекту краудинга. Термодинамические последствия наличия недоступного объема для компонентов реакции называют эффектом исключенного объема.

С ростом концентрации макромолекул уменьшается количество свободного объема, доступного для других молекул. Следствием этого является уменьшение случайности распреде-

ления частиц в концентрированных растворах, приводящее к уменьшению энтропии «переполненных» растворов. Уменьшение энтропии увеличивает величину свободной энергии, тем самым значительно увеличивая термодинамическую активность растворенных веществ, что оказывает сильный эффект на все процессы, связанные с активностью. При этом эффект исключенного объема, вызванный высокой концентрацией определённых молекул, влияет не только на термодинамические характеристики этих молекул, но и на активности других веществ, присутствующих в малых концентрациях. То есть можно утверждать, что в неидеальном растворе с эффектом краудинга поведение молекулы будет другим, чем в разбавленном растворе. Действительно, с помощью различных систем *in vitro*, моделирующих краудинг, было показано, что эффект исключенного объема оказывает значительное влияние на конформационную стабильность и структурные свойства биологических макромолекул. Также макромолекулярный краудинг может влиять на состояние равновесия биологических процессов таких как фолдинг белка, реакции ассоциации белка с малыми молекулами, ферментативная активность, белок-белковые взаимодействия, патологическая агрегация белков, формирование амилоидных фибрилл [61].

Поскольку эффект исключенного объема должен быть результатом неспецифического воздействия краудинг-агента на исследуемый белок, для экспериментов предпочтительно использовать как можно больше типов молекул, отличающихся формой и размерами. Для выявления эффекта краудинга на фоне специфических взаимодействий могут быть использованы следующие критерии: 1) аналогичные эффекты с различными краудинг-агентами (демонстрирующие отсутствие значительного взаимодействия между белком и краудером); 2) непропорциональное усиление эффекта, наблюдаемого при увеличении концентрации краудинг-агента; 3) большие краудинг-агенты должны вызывать больший эффект чем маленькие частицы, при том же количестве на единицу объема; 4) маленькие краудинг-агенты должны вызывать больший эффект чем большие частицы при аналогичной массовой концентрации [62]. Также ранее было показано, что для изучения эффектов макромолекулярного краудинга целевая молекула, функция которой исследуется, и краудинг-агент должны иметь приблизительно равные размеры [12].

Было получено, что для ключевых ферментов гликогенолиза молекулярный краудинг служит фактором, оказывающим существенное влияние на взаимодействия типа белок-лиганд, белок-белок, конформационные переходы и образование надмолекулярных структур и, как следствие, на механизмы функционирования ферментов *in vivo*. Обнаружено влияние краудинга на ассоциацию PhK (киназыфосфорилазы) и Phb (гликогенфосфорилазы) [63]. Показано, что краудинг стимулирует ассоциацию PhK в присутствии Ca^{2+} и Mg^{2+} с образованием надмолекулярных структур, включающих сотни молекул фермента [64]. Также доказано, что для боль-

шинства ферментов краудинг может оказывать эффект повышения термической стабильности [12].

В условиях макромолекулярного краудинга снижается скорость диффузии, сдвигается равновесие для белок-субстратных взаимодействий и изменяется конформационная динамика ферментов. Комбинация этих основных механизмов определяет эффекты, наблюдаемые для конкретной ферментативной реакции в условиях ограниченного свободного пространства. В целом, констатируется, что молекулярный краудинг может как увеличивать, так и уменьшать ферментативную активность различных систем [12].

Следует отметить, что экспериментальные данные о совместной работе ферментов в полиферментных цепях в условиях макромолекулярного краудинга в настоящее время практически отсутствуют.

1.3 Диффузия внутри клеток и метаболизм

1.3.1 Общие принципы диффузии во внутриклеточном пространстве и её биологическая роль

В клетке все движется, и взаимодействия между (макро)молекулами динамичны. Перемещение компонентов позволяет белкам занимать различные позиции в клетке и придает смысл понятию энтропии. Диффузией называется перемещение молекул без приложения внешней работы, что отличает её от других типов движения, которые происходят внутри клеток, таких, как например транспорт белка через мембраны. Диффузия позволяет молекулам встречать друг друга в клетке: субстраты должны находить ферменты, факторы транскрипции должны находить участки на ДНК, мембранные белки должны находить мембрану и т. д. Важность коэффициентов диффузии белков следует оценивать в контексте различных уровней внутриклеточной сложности, в ряде случаев диффузия белков играет определяющую роль в физиологии и биохимической организации клетки [65].

Общие принципы диффузии белков

В процессе перемещения молекул внутри клетки происходит их столкновение друг с другом. Направление движения молекулы является произвольным, а траектория случайной, если среда однородна. Однако такой параметр, как шаг перемещения молекулы в пространстве за определенный интервал времени, не является случайным. Шаг определяется размером молекулы, ее взаимодействием с растворителем и температурой. В совокупности эти свойства молекул описывает коэффициент диффузии (D). Распределение молекул в пространстве и изменение их концентрации во времени представляют в виде уравнения одномерной диффузии (не зави-

сящей от перемещений молекул в других измерениях) [66]:

$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c(x,t)}{\partial x^2}. \quad (23)$$

Здесь $c(x,t)$ – концентрация молекул в области пространства с координатой x в момент времени t , D – коэффициент диффузии. Решение данного уравнения позволяет описать передвижение молекул в пространстве из исходной точки за определенный промежуток времени [66]:

$$c(x, t) = \frac{N}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{\frac{-x^2}{4Dt}}, \quad (24)$$

где N – количество молекул.

Это решение также описывает плотность вероятности того, что одна диффундирующая молекула окажется в точке x через промежуток времени t при условии, что частицы между собой не взаимодействуют или этим взаимодействием можно пренебречь. Важно отметить, что в реальной ситуации молекулы могут взаимодействовать друг с другом, например, за счет изменения локальной вязкости. В таком случае диффузия не считается нормальной. Для многомерного случая средневзвешенное значение расстояния d между молекулами составляет:

$$d = \sqrt{2nDt}, \quad (25)$$

где n – количество измерений.

Уравнения (24) и (25) не учитывают возможное существование границ и препятствий для диффузии, таких как клеточная мембрана, и поэтому являются наиболее точными, когда масштаб наблюдений меньше размера клетки. Для систем большего размера необходимо проводить детальное моделирование с целью учета размера и формы клетки.

Из уравнения скорости бимолекулярной реакции k между молекулами m_1 и m_2 :

$$k = k_{on}[m_1][m_2] \quad (26)$$

можно рассчитать необходимое время, при котором однозначно произойдет взаимодействие внутри системы размером 1 мкм^3 , если коэффициенты диффузии молекул $10 \text{ мкм}^2/\text{с}$. Оно составляет около 1 с . Константа скорости k_{on} зависит от диффузии и составляет около $10^9 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ при концентрации молекул около 1 нМ , что эквивалентно 1 молекуле в 1 мкм^3 . В такой системе скорость диффузии равна 10^{-9} М с^{-1} , в результате чего взаимодействие молекул происходит через время равное 1 с . Аналогичный результат был получен при помощи моделирования реакции ассоциации в сфероцилиндре длиной $1,5 \text{ мкм}$ и шириной 1 мкм . Время, которое требуется для перемещения молекул и их последующего взаимодействия, составило от 0 до 3 с , со средним значением $0,6 \text{ с}$ [65].

Внутри клетки белок может формировать комплексы с медленно диффундирующими

молекулами в цитоплазме, что снижает его коэффициент диффузии. Тогда эффективный коэффициент диффузии рассчитывают следующим образом:

$$D_{eff} = f_{free}D_{free} + (1 - f_{free})D_{bound}, \quad (27)$$

где D_{eff} – коэффициент эффективной диффузии, f_{free} – фракция свободного (несвязанного) белка, D_{bound} и D_{free} – коэффициенты диффузии связанного и свободного белка [65].

Диффузионно-контролируемые реакции

Коэффициенты диффузии реагирующих веществ определяют кинетические параметры диффузионно-контролируемых реакций. Скорость реакции ассоциации между двумя молекулами зависит от их концентрации и константы скорости k_{on} , как показано в уравнении (26). Если реакция ограничена диффузией, то каждое столкновение между двумя молекулами приводит к взаимодействию, в связи с чем k_{on} зависит только от коэффициентов диффузии двух белков. Таким образом, для двух белков, имеющих сферическую форму и такую поверхность, что каждый а. о. на поверхности может вступать в реакцию, диффузионно-контролируемая бимолекулярная константа скорости k_{on} задаётся уравнением

$$k_{on,diff} = 4\pi(D_1 + D_2)(R_1 + R_2), \quad (28)$$

где D_1 и D_2 – коэффициенты диффузии белков с радиусами R_1 и R_2 .

Можно оценить, что для белков с радиусом 5 нм коэффициент диффузии составляет ~ 10 мкм²/с в цитоплазме *E. coli* и ~ 100 мкм²/с в разбавленном растворе, а значение $k_{on,diff}$ составляет $\sim 10^8$ М⁻¹с⁻¹ в цитоплазме и $\sim 10^9$ М⁻¹с⁻¹ в разбавленном растворе. Это уравнение справедливо только для диффузии молекул в трехмерном пространстве, и как таковое оно не может быть использовано для реакций с участием мембранных белков. Кроме того, в действительности лишь некоторые аминокислотные остатки на поверхности белков могут участвовать в реакциях, в связи с чем константа k_{on} может принимать значения в интервале 10^5 - 10^6 М⁻¹с⁻¹ [68]. Наличие нескольких сайтов связывания в белке или элементов структуры, обеспечивающих электростатическое взаимодействие, может увеличить значение k_{on} [69]. Таким образом, предельное значение параметров, при котором реакция перестает зависеть от диффузии, обусловлено свойствами ферментов. То есть движение белков будет не диффузионным, если оно вызвано электростатическим притяжением. Если же взаимодействие между белками является самой медленной стадией реакции, то такая реакция является диффузионно-контролируемой.

В клетке степень ограничения скорости того или иного процесса диффузией зависит также от других процессов, потому что два белка могут не присутствовать постоянно в реактивной форме. Эти процессы включают синтез белка, посттрансляционные модификации, высвобождение белков из других комплексов, транспорт через мембраны или циклические изменения конформационных состояний [67].

Если все аминокислотные остатки на поверхности двух ферментов *A* и *B* могут участвовать во взаимодействии, то такие белки будут формировать комплекс при любом соударении. Если же только некоторые аминокислотные остатки обеспечивают белок-белковое взаимодействие, то таким ферментам придется чаще сталкиваться, чтобы образовать комплекс. В обоих случаях, более высокая частота столкновений приводит к более высокой вероятности образования комплекса. Однако, когда белок *A* может принимать две конформации, только одна из которых способна образовывать комплекс с белком *B*, величина коэффициента диффузии оказывается важной. Допустим, *A* проводит в среднем 10 с в неактивном состоянии и 10 с в активном, а среднее время, за которое *A* и *B* находят друг друга, равно 1 с. В этом случае время реакции составит 11 с. При этом коэффициент диффузии белка *B* является относительно несущественным (его изменение в два раза приводит к изменению времени реакции на 0,5-1 с), и такая реакция не ограничена диффузией. Это наблюдается, потому что активный период *A* значительно больше, чем время необходимое для столкновения. Обратная ситуация (если активный период *A*, например, 0,5 с) делает реакцию диффузионно-контролируемой. Реальным примером снижения важности коэффициента диффузии является связывание ингибитора транскрипции LacI с его сайтом-мишенью ДНК. В процессе поиска сайта связывания LacI сначала связывает ДНК неспецифически и затем сканирует ее посредством одномерной диффузии вдоль контура ДНК в случайном направлении, что занимает около 90% времени поиска [70]. Если бы LacI мог диффундировать быстрее, это могло бы сократить общее время поиска только до 90% от фактически затрачиваемого времени. Таким образом, значимость диффузии зависит от внутриклеточного контекста [65].

В публикациях встречается не очень много примеров, демонстрирующих важность коэффициентов диффузии. Допустим, количество белков в клетке *E. coli* постоянно, но размер клетки уменьшился, тогда расстояние, которое преодолевают молекулы за счет диффузии, станет меньше, но при этом количество молекул на единицу объема увеличится, что приведет к замедлению диффузии. Если клетка становится больше, расстояние увеличится, но диффузия станет быстрее. На основании этих рассуждений была построена модель, показавшая, что для прокариот оптимальный с точки зрения времени диффузии диаметр клетки равен 1,1 мкм, а для эукариот – 15,7 мкм. Не смотря на ряд недостатков данной модели, полученные диаметры сравнимы с типичными размерами прокариотических и эукариотических клеток. Это указывает на то, что соотношение размера клеток и концентрации макромолекул было оптимизировано в ходе эволюции для обеспечения наиболее быстрой диффузии [71].

Существует много примеров, когда коэффициенты диффузии оказывают воздействие на эффективность биологических процессов, но не определяют возможность их существования. Далее будут приведены два примера явлений, которых не было бы, если бы не определенные

коэффициенты диффузии участвующих молекул [65].

Одним из ярких примеров диффузионно-контролируемого процесса является деление клетки *E. coli*. Ключевым белком в клеточном делении является FtsZ, который образует кольцо посередине клетки, помогающее вытянуть клеточную мембрану внутрь. Положение кольца FtsZ частично определяется системой Min. Система Min состоит из белков MinC, MinD и MinE. Каждая компонента системы Min участвует в создании динамических осцилляций ингибирования FtsZ между двумя полюсами бактериальной клетки, что приводит к формированию кольца в центре клетки и её делению на две равные части. Важной особенностью, необходимой для создания осцилляций в пространстве, является тот факт, что в связанном с мембраной состоянии MinD имеет меньший коэффициент диффузии, чем в свободном. Следовательно, именно коэффициенты диффузии определяют, могут ли существовать пространственно-временные осцилляции Min-системы, без которых было бы невозможно деление клетки *E. coli* [72].

Внутри живой клетки длиной в несколько микрометров молекулы белка могут равномерно распределиться в течение нескольких секунд. Из-за этого кажется маловероятным образование стабильных градиентов концентрации какого-то белка вдоль длины клетки. Однако теоретически было показано, что при особых обстоятельствах могут образовываться белковые градиенты. Рассматривали три белка в клетке: киназу на одном из полюсов, фосфатазу в цитоплазме и некий белок-субстрат, который может переходить между фосфорилированным и нефосфорилированным состояниями. Чтобы система могла образовать градиент белка-субстрата, коэффициенты диффузии двух его состояний должны быть различными. Так, в клетке длиной 5 мкм с константой скорости киназы 10 мкм/с, константой скорости фосфатазы 1 с^{-1} и с коэффициентами диффузии фосфорилированной и нефосфорилированной форм белка-субстрата соответственно $0,3 \text{ мкм}^2/\text{с}$ и $10 \text{ мкм}^2/\text{с}$ может быть создан 10-кратный градиент концентрации белка-субстрата по длине клетки. Данное явление в клетке также может существовать исключительно благодаря различиям в коэффициентах диффузии [73].

Приведенные примеры показывают, что ограниченная диффузия молекул внутри клетки может не только быть причиной замедления метаболических процессов, но и играть важную функциональную роль, не смотря на пространственный масштаб системы.

1.3.2 Стратегия вязкоадаптации клеток

Регуляторная роль вязкости внутриклеточной среды часто обсуждается в свете проблемы адаптации живых организмов к неблагоприятным условиям обитания, в частности, температурным. Как известно, теплокровные организмы обитают в самых разных условиях среды, поддерживая почти постоянную внутреннюю температуру. Тем не менее, многие организмы, лишен-

ные терморегуляции, также переносят масштабные и непредсказуемые колебания температуры. Так, например, дрожжи *S. cerevisiae* могут расти и делиться при температурах $>30\text{ }^{\circ}\text{C}$ [74]. Другие организмы адаптировались и к более экстремальным условиям и могут выдерживать температуры от 80 до $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ [6]. Такая универсальность примечательна, учитывая многочисленные термодинамические проблемы, с которыми сталкивается клетка при изменении температуры. Многие клеточные процессы, такие как сворачивание белков, реализуются за счет небольших энергетических различий между состояниями и поэтому очень чувствительны к температуре. Помимо внутримолекулярных процессов, температура оказывает сильное влияние и на межмолекулярные взаимодействия, поскольку снижает/повышает вязкость среды, тем самым увеличивая скорость диффузии любых компонентов. Изменение скорости молекулярных взаимодействий имеет многочисленные последствия, включая изменение скорости диффузионно контролируемых реакций и передачи сигнала [6]. При большом количестве таких клеточных процессов изменение температуры окружающей среды может быть катастрофическим для метаболизма, и тем не менее многие организмы переносят эти изменения. Как именно температурная зависимость диффузии проявляется в живых клетках с очень сложными и динамическими сетями взаимодействия в значительной степени неизвестно. В настоящий момент также довольно мало известно о клеточных стратегиях, которые могут существовать для смягчения этих проблем. Ряд работ 1970-х гг. раскрыл гомеостатический механизм контроля текучести клеточных мембран в ответ на изменение температуры [6]. Клетки реагируют на изменения температуры, регулируя содержание липидов в своих мембранах для поддержания соответствующей вязкости. Данный процесс получил название «гомеовязкая адаптация». Таким образом клетка может контролировать скорость межмолекулярных взаимодействий в мембране независимо от температуры [75].

В работе [6] сравнили скорость контролируемой диффузией экзогенной модельной реакции *in vivo* и *in vitro* в зависимости от температуры. Была обнаружена форма клеточной адаптации, которая делает скорость реакции инвариантной к температурным изменениям *in vivo*, несмотря на сильную температурную зависимость *in vitro*. Этот ответ позволяет клетке поддерживать почти постоянную внутриклеточную вязкость, несмотря на изменения температуры. В результате скорости диффузии и скорости реакций, контролируемых вязкостью, остаются неизменными при температуре $>20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Клетки способны воздействовать на внутриклеточную диффузию посредством регулируемого производства низкомолекулярных соединений. Данный процесс был назван вязкоадаптацией [6]. Считается, что дрожжевые клетки способны противодействовать повышенной температуре, голоданию, повреждению митохондрий и стохастическому падению уровня АТФ, синтезируя гликоген и трегалозу и тем самым замедляя диффузию. Таким образом, цитозольная вязкость является тонко регулируемым свойством клетки, в

котором важную функцию выполняют гликоген и трегалоза. Помимо вязкоадаптации существуют и другие механизмы регуляции подвижности биомолекул в клетках, такие как сборка индуцированных стрессом конденсатов [76], pH-индуцированная полимеризация белков [77] и механизмы, основанные на молекулярном краудинге [12]. Некоторые стрессовые для клетки условия, провоцирующие вязкоадаптацию, также могут вызывать эти реакции, однако вязкоадаптация отличается феноменологически и механистически. Из всех перечисленных механизмов только вязкоадаптация влияет на подвижность отдельных белков или вовлекает гликоген и трегалозу в контроль диффузии белка. Кроме того, вязкоадаптация уникальна тем, что служит одновременно гомеостатическим механизмом и быстрой реакцией на стресс. Вязкоадаптация может иметь отношение к переходу бактериальной цитоплазмы в «стекловидное» состояние с низкой метаболической активностью и изменению вязкости раковых клеток, которые часто хранят высокий уровень гликогена. Более того, существование вязкоадаптации показывает, что цитозольная вязкость может быть важным, но упускаемым из виду параметром в моделях индуцированного стрессом разделения фаз. Многие такие модели фокусируются на изменениях биофизических свойств конденсатов, предполагая при этом, что состояние большей клеточной среды является относительно постоянным [6].

«Адаптация» вязкости в изменяющейся среде может быть механизмом настройки скорости контролируемых диффузией молекулярных взаимодействий, химических реакций, сигнальных каскадов, а также сборки и разборки комплексов. Кроме того, замедление клеточных процессов в больших масштабах может сберечь энергию при недостатке питательных веществ. Аналогично, накопление трегалозы в спорах растений вызывает потерю молекулярной подвижности с соответствующим значительным падением метаболической активности [29]. Здесь точно так же вязкоадаптация может быть стратегией снижения расхода энергии при сохранении критических клеточных функций. Для вязкоадаптации в ответ на нагревание необходимы и гликоген, и трегалоза, в то время как при острой депривации глюкозы достаточно одного только гликогена. Трегалоза продуцируется исключительно пойкилотермными организмами, что согласуется с ее ролью в буферной диффузии против температурных изменений, тогда как синтез гликогена сохраняется у людей. Это повышает вероятность того, что гликоген способствует адаптации вязкости у таких гомойотермных организмов как млекопитающие [6].

1.4 Эффекты сред на биолюминесцентную реакцию бактерий

1.4.1 Механизм реакции, катализируемой бактериальной люциферазой

Люциферазами называют специальные ферменты, обеспечивающие в природе яркое свечение живых организмов в видимом спектральном диапазоне (то есть выполняющие функцию

биолюминесценции). Примечательной особенностью явления биолюминесценции является то, что люциферазы различных групп организмов – это разные по структуре белки, катализирующие различающиеся по химической основе реакции.

Светящиеся бактерии, в отличие от большинства других биолюминесцентных организмов, поддерживают непрерывное светоизлучение с момента начала синтеза белков *lux*-оперона. Бактериальная люцифераза является флавинзависимой монооксигеназой. Она катализирует реакцию окисления восстановленного флавинонуклеотида (FMNH₂) и длинноцепочечного альдегида (RCHO) молекулярным кислородом (O₂). Продуктами реакции являются окисленный флавинонуклеотид (FMN), карбоновая кислота (RCOOH) и вода (H₂O), а также квант света в сине-зеленой области спектра (hν) (спектральный максимум при 485-490 нм) [78] (Рисунок 1.5).

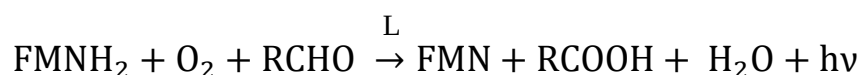


Рисунок 1.5 – Уравнение реакции, катализируемой бактериальной люциферазой (L). Обозначения расшифрованы в тексте выше.

Высказывались предположения, что физиологическое значение биолюминесценции не всегда связано с формированием светового сигнала. Было продемонстрировано, что бактериальная люминесценция может стимулировать репарацию ДНК, облегчая процесс фотореактивации. С другой стороны, существует гипотеза, что биолюминесценция эволюционно возникла не для производства света, а как механизм детоксикации аэробной атмосферы. Результаты, указывающие на то, что целентеразин – субстрат в реакции биолюминесценции многих морских животных, может действовать как антиоксидант, предполагают, что первичной ролью биолюминесценции может быть защита клеток от активных форм кислорода. Было высказано предположение, что бактериальная люцифераза также может играть роль в защите бактерий от окислительного стресса. Помимо этого, открытие того, что при избыточной продукции люциферазы *Vibrio harveyi* в клетках *E. coli* она может действовать как источник супероксида в отсутствие альдегида, но не в его присутствии, потенциально является поддержкой этой гипотезы [79].

Структура бактериальной люциферазы

Бактериальная люцифераза состоит из двух гомологичных, но не идентичных субъединиц α и β, обе из которых имеют структуру (β/α)₈- или ТІМ-бочонка. Хотя для сохранения ферментативной активности необходима β-субъединица, каталитический центр находится исключительно на α-субъединице [80]. Две субъединицы имеют в последовательности примерно 30–

32% идентичных аминокислотных остатков, однако α -субъединица больше, чем β -субъединица (40–42 vs 36–37 кДа). Наиболее существенное различие в составе двух субъединиц наблюдается на участке 260–290 а.о., высоко консервативном для α -субъединиц люцифераз всех известных в настоящее время светящихся бактерий [81].

По кинетическим характеристикам катализируемой реакции различают два типа бактериальных люцифераз: «медленные» и «быстрые». Люциферазы видов *Photobacterium*, *Aliivibrio* и *Shewanella* относятся к «быстрым», а люциферазы *Vibrio* и *Photorhabdus* – к «медленным» [82]. Кинетические различия двух типов люцифераз проявляются в отличиях скоростей связывания субстратов, времени преобразования интермедиатов реакции, а также скорости распада интермедиата гидропероксифлавина. Аминокислотные последовательности «медленных» люцифераз имеют большее внутреннее сходство, чем «быстрых». Филогенетический анализ последовательностей бактериальных люцифераз из 21-го вида выявил две клады, в соответствии с их принадлежностью к «быстрому» или «медленному» типу [83].

По кристаллической структуре люциферазы *Vibrio harveyi* со связанным FMN (PDB ID: 3FGC) были выявлены ключевые аминокислотные остатки, формирующие активный центр фермента: Phe6, Lys42, Glu43, Ala74, Ala75, Val77, Cys106, Agr107, Lys109, Tyr110, Agr125, Val173, Glu175, Ser176, Thr179 и Trp192 [84]. Экспериментально было показано, что мутации перечисленных остатков часто приводят к изменению связывания FMN, образования C4a-(гидро)пероксифлавина и изменению его стабильности, что в итоге вызывает уменьшение количества испускаемых квантов света. Re-сторона изоаллоксазинового кольца связывается областью активного центра, сформированной α Cys106, гидрофобными остатками Val173, Ile191 и цис-пептидной связью Ala74–Ala75 [84]. Был сделан вывод, что α Cys106 является одним из ключевых аминокислотных остатков, отвечающих за стабильность пероксифлавинового интермедиата и связывание альдегида. Его замена снижала количество испускаемых квантов света [85]. Было обнаружено, что алкилирование α Cys106 влияет на ферментативную реакцию, блокируя связывание FMNH₂ и альдегида [86]. Замена α Cys106 на Ala, Ser и Val дестабилизирует пероксифлавиновый интермедиат, в результате чего его скорость распада возрастает в два раза по сравнению с ферментом дикого типа [87]. Редкая цис-пептидная связь между α Ala74 и α Ala75 создает небольшую полость, что предположительно является важным для правильного позиционирования аминокислотных остатков, определяющих активность люциферазы [88].

В кристаллических структурах фермента без флавина (PDB ID: 1LUC) часть α -субъединицы, сформированная из остатков 262–291, является разупорядоченной. Этот сегмент называется «мобильной петлей», его протеолитическое расщепление приводит к инактивации фермента. Однако связывание FMN или поливалентных анионов защищает фермент от протеолиза. Мобильная петля люциферазы была объектом исследований при помощи мутагенеза. Бы-

ло высказано предположение, что без мобильной петли фермент не способен стабилизировать интермедиаты реакции. Данные мутагенеза подтверждают гипотезу о том, что подвижная петля является частью механизма закрытия «крышки» активного центра, характерного для других ТИМ-белков [80].

β -субъединица бактериальной люциферазы гораздо менее изучена. Из её аминокислотных остатков выявлена функциональная роль β Tyr151 [84]. β Tyr151 находится на поверхности субъединицы и предположительно взаимодействует с α Phe272 мобильной петли α -субъединицы, поддерживая её активную конформацию. Этот факт подтверждает представление о стабилизирующей функции β -субъединицы. Наличие в структуре бактериальной люциферазы важной для катализа мобильной петли позволяет предположить, что вязкость может оказывать значительное воздействие на эффективность катализируемой реакции в соответствии с теорией Крамерса [32].

Кинетических механизм бактериальной люциферазы

Бактериальная люцифераза принадлежит к семейству двухкомпонентных монооксигеназных ферментов, где субстрат FMN восстанавливается редуктазой перед переносом люциферазе для осуществления оксигеназной активности [89]. FMNH₂ нестабилен в аэробных условиях и быстро окисляется кислородом с образованием перекиси водорода [90]. Перенос FMNH₂ между двумя белками должен быть хорошо скоординирован, чтобы предотвратить его потери и избежать возможных повреждений от образующегося в результате распада пероксида. Известно, что передача восстановленного флавина в двухкомпонентных монооксигеназах может происходить либо по механизму прямого переноса, либо через свободную диффузию. При этом прямой перенос требует взаимодействия двух белков [91]. Ранее было показано, что люцифераза может эффективно использовать FMNH₂, генерируемый неродственными редуктазами, например, NAD(P)H-флавин: редуктазой (Fre) *E. coli* [92], NADPH-флавин: редуктазой P (FRP) *V. harveyi* [93] и редуктазным компонентом C₁ из *Acinetobacter baumannii* [94]. Сопоставимая способность FRP *E. coli* и *V. harveyi* поставлять восстановленный флавин позволила сделать вывод о том, что белковые взаимодействия между редуктазными и оксигеназными компонентами не являются обязательными. Кроме того, стабильные комплексы не были обнаружены в системах FRP+люцифераза [92] и LuxG+люцифераза [95]. Для последней системы исследование нестационарной кинетики подтвердило перенос FMNH₂ преимущественно через свободную диффузию [96]. Этот перенос был изучен путем измерения скорости диссоциации FMNH₂ из LuxG и его последующего переноса на различные типы оксигеназных акцепторов. Было обнаружено, что скорость диссоциации FMNH₂ не зависит от акцепторной оксигеназы, что указывает на отсутствие влияния белок-белкового взаимодействия на диссоциацию FMNH₂ [96].

Ключевыми интермедиатами реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, считаются комплексы фермента с 1,5-дигидрофлавинонуклеотидом (Интермедиат I), с 4а-гидроперокси-5-гидрофлавинонуклеотидом (Интермедиат II), с 4а-пероксиполуацеталь-5-гидрофлавинонуклеотидом – Интермедиат IIА, и с 4а-гидрокси-5-гидрофлавинонуклеотидом – Интермедиат III (Рисунок 1.6). Интермедиат II подвержен темновому распаду с образованием FMN и перекиси водорода. Интермедиат III образуется в электронно-возбужденном состоянии (считается первичным эмиттером бактериальной биолюминесценции).

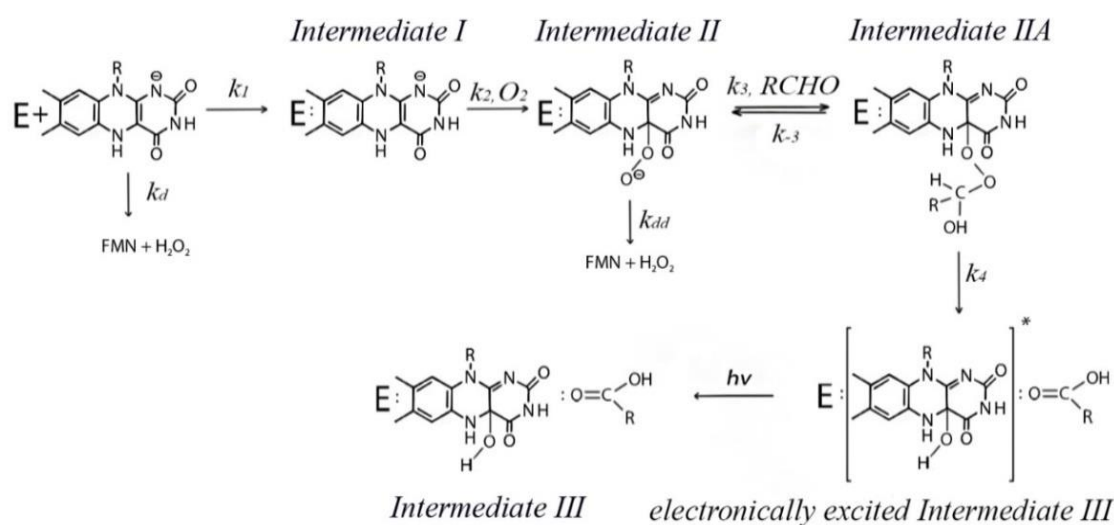


Рисунок 1.6 – Структура основных интермедиатов реакции, катализируемой бактериальной люциферазой.

Присутствие в кинетическом механизме двух темновых процессов, а именно автоокисления FMNH₂ и распада Интермедиата II, конкурирующих со светоизлучающей реакцией, является одной из причин относительно небольшого квантового выхода биолюминесценции бактериальной люциферазы (10-16% [97]). Это позволяет предположить, что в случае диффузионного контроля данных процессов, с ростом вязкости могут быть созданы условия, смещающие равновесие в сторону светоизлучающего пути реакции, и таким образом повышающие количество испускаемых квантов света.

Некоторые исследования показали наличие дополнительных стадий реакции, кроме представленных на рисунке 1.6. Было высказано предположение, что после связывания люциферазой восстановленного флавина происходит изомеризация фермента (процесс k₃ на рисунке 1.7) [98]. Оно было основано на том, что скорость формирования Интермедиата II при непосредственной реакции комплекса люцифераза-FMNH₂ с кислородом была в 4 раза выше, чем при смешивании свободной люциферазы с восстановленным флавином.

Если первоначально сформированный комплекс люцифераза-FMNH₂ реагировал бы с кислородом непосредственно, формируя Интермедиат II за одну стадию, тогда при высоких концентрациях фермента скорость формирования этого интермедиата была бы аналогична скорости наблюдаемой при смешивании комплекса люцифераза-FMNH₂ с кислородом. Экспериментально было показано, что эта ситуация не наблюдается, и это предполагает отсутствие взаимодействия предварительно сформированного комплекса с кислородом до мономолекулярной реакции E→E' (Рисунок 1.7). Кроме того, подобный двухступенчатый механизм ранее был продемонстрирован для люциферазы *P. phosphoreum* [100], а для *V. harveyi* было показано наличие конформационной перестройки и во время каталитического акта [101]. Важно отметить, что данная стадия, может представлять собой как конформационную перестройку фермента, так и, возможно, ионизацию связанного восстановленного флавина [102].

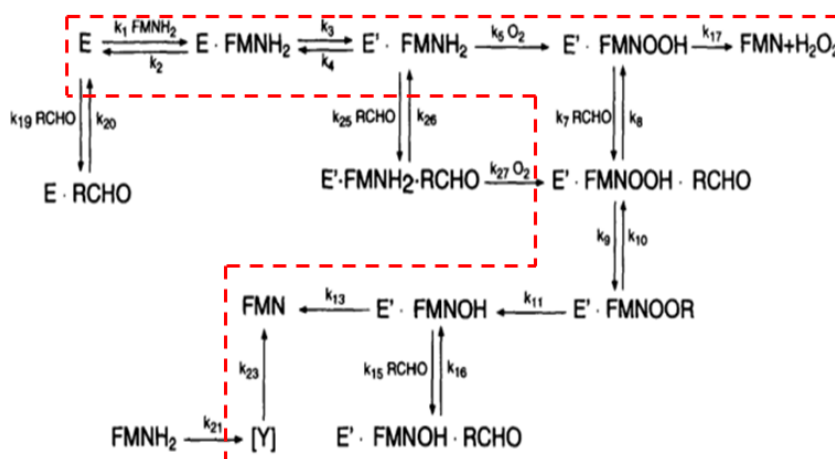


Рисунок 1.7 – Кинетический механизм реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *V. harveyi*, предложенный в работе [99]. E – фермент. Пунктиром выделены стадии, включенные в математическую модель нестационарной кинетики в работе [98].

Реакция Интермедиата I с кислородом протекает очень быстро ($2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ при 4°C для фермента *V. harveyi*), тогда как связывание восстановленного флавина с люциферазой значительно медленнее ($2 \cdot 4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ при 4°C для фермента *V. harveyi*) с константой диссоциации в микромолярном диапазоне [152]. Предположительно, формирование 4а-пероксифлавина в активном центре люциферазы происходит через одноэлектронный перенос от флавина к кислороду, в результате чего образуется радикальная пара, распадающаяся с образованием 4а-пероксифлавина, который имеет максимум спектра поглощения около 370–380 нм. Константа скорости этого процесса для люциферазы из *V. harveyi* составляет 350 s^{-1} при 25 °C, для люциферазы из *V. campbellii* – 253 s^{-1} при 4 °C и демонстрирует линейную зависимость от концен-

трации кислорода. Распад 4а-пероксифлавина можно зарегистрировать по увеличению поглощения при 450 нм, что отражает образование окисленного FMN [98]. Однако, как было упомянуто выше, образование 4а-пероксифлавина происходит намного медленнее, когда люциферазу смешивают со свободным FMNH⁻ в насыщенном кислородом растворе. Это говорит о том, что связывание свободного FMNH⁻ с люциферазой является лимитирующей стадией [98]. Было установлено, что скорость свободного связывания FMNH⁻ с люциферазой из *V. campbellii* примерно в 36,5 раз медленнее, чем реакция с кислородом [96]. Было показано, что образование 4а-пероксифлавина в активном центре «быстрой» люциферазы *P. leiognathi* TH1 происходит значительно медленнее, чем в случае «медленной» люциферазы *V. campbellii*. Реакция формирования 4а-пероксифлавина для люциферазы *P. leiognathi* TH1 является двухстадийной. Константа скорости медленной фазы была оценена как $\sim 17 \text{ с}^{-1}$ при 4 °C, при этом скорость быстрой фазы не была определена экспериментально, т.к. она завершается за мертвое время анализатора кинетики методом остановленного потока [96].

4а-пероксифлавин является достаточно стабильным в составе Интермедиата II, что позволяет его выделить и охарактеризовать при помощи ЯМР-спектроскопии. Результаты ¹³C-ЯМР-спектроскопии показывают, что атом кислорода присоединяется к углероду флавина в положении 4а [103]. При 2 °C время полураспада Интермедиата II составляет приблизительно 1 час. В присутствии альдегида раствор очищенного Интермедиата II реагирует с излучением света и образованием одной молекулы FMN на каждую молекулу интермедиата. 4а-пероксифлавин имеет максимум поглощения на длине волны около 370–380 нм с относительно слабым пиком флуоресцентного излучения в области 480–510 нм при возбуждении на длине волны 370 нм.

Эксперимент с использованием изотопа ¹⁸O₂ показал, что один атом кислорода включается в конечный продукт – карбоновую кислоту [104]. Этот результат подразумевает, что присоединение кислорода протекает через образование аддукта между 4а-пероксифлавином и альдегидом во время катализа. Хотя Интермедиат IIА еще не был выделен и охарактеризован, спектры, указывающие на его существование, были получены с помощью методов нестационарной кинетики.

В предыдущих исследованиях было получено, что разложение тройного комплекса люциферазы с FMN и карбоновой кислотой происходит в 10-15 раз медленнее, чем затухание люминесценции, и что активность люциферазы восстанавливается только после высвобождения флавина. Скорость диссоциации FMN и восстановления активности люциферазы в случае комплекса люцифераза-FMN значительно быстрее, что указывает на то, что высвобождение жирных кислот играет ключевую роль в скорости диссоциации FMN из тройного комплекса. Было показано, что разложение тройного комплекса происходит в результате упорядоченного про-

цесса, включающего медленное высвобождение жирной кислоты с последующим более быстрым высвобождением флавина. Это позволяет предположить, что стадия, лимитирующая скорость оборота люциферазы, происходит после испускания света и является ключевой стадией в условиях с непрерывным излучением света (например, в клетках) [81].

Хотя реакция, катализируемая бактериальной люциферазой, долгое время интенсивно изучается, механизм формирования возбужденного интермедиата все еще обсуждается. 4а-гидроксифлавин, как полагают, является эмиттером реакции, поскольку его флуоресцентные характеристики аналогичны спектрам излучения, обнаруженным в реакциях люциферазы *in vivo* и *in vitro* [105]. Эксперименты с использованием аналога (5-децил-4а-гидрокси-4а,5-дигидрофлавина) для образования комплекса с бактериальной люциферазой *V. harveyi* также подтверждают роль гидроксифлавина как светоизлучающего интермедиата. Хотя флуоресценция этого аналога очень слаба, интенсивность флуоресценции возрастает при связывании с люциферазой. Этот результат указывает на то, что окружение активного центра люциферазы может увеличивать квантовый выход флуоресценции 4а-гидроксифлавина [105]. Было предложено несколько моделей для описания механизма генерации возбужденного состояния 4а-гидроксифлавина, в том числе посредством реакции Байера-Виллигера [106], образования диоксиранов [107] и механизма химически инициированной электронно-обменной люминесценции [108, 109]. Эти модели различаются в основном механизмом трансформации Интермедиата ПА, приводящей к генерации возбужденного эмиттера.

Несмотря на то, что в большинстве работ рассматривается только поочередное связывание субстратов (сначала – восстановленного флавина, а затем – альдегида), было высказано предположение, что фермент может связывать субстраты в случайном порядке [87]. Однако для люциферазы *V. harveyi* было показано, что предварительное связывание альдегида с ферментом может блокировать связывание восстановленного флавина, что приводит к инактивации. Процесс связывания альдегида люциферазой является обратимым [99].

Также, ранее было показано, что скорость формирования 4а-гидропероксифлавина зависит от концентрации альдегида при смешивании раствора, содержащего фермент, восстановленный фламин и альдегид с раствором, насыщенным кислородом. При насыщении альдегидом скорость формирования этого интермедиата была в 100 раз медленнее, чем в отсутствии альдегида, что указывает на то, что Интермедиат ПА может быть сформирован до присоединения кислорода [99].

Для кинетики реакции бактериальной люциферазы *V. harveyi* был применен метод численного моделирования [98, 99]. Несколько кинетических кривых светоизлучения, различающихся концентрацией альдегида, были аппроксимированы при помощи различных моделей. В результате численного моделирования были получены константы скоростей отдельных стадий.

Модели включали в себя различные упомянутые выше стадии: от 15-ти констант скорости (область, выделенная штриховыми линиями на рисунке 1.7) до 21-й константы скорости (все стадии на рисунке 1.7) [99]. Стоит отметить, что в литературе отсутствуют данные о численном моделировании кинетики «быстрых» бактериальных люцифераз.

1.4.2 Эффекты сред на реакцию, катализируемую бактериальной люциферазой

В литературе достаточно редко встречаются данные о влиянии различных веществ-сорастворителей на реакцию, катализируемую бактериальной люциферазой. Огромное количество исследований эффектов разных физико-химических факторов на бактериальную биoluminesценцию *in vitro* было проведено на биферментной системе люцифераза+NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза. Причиной тому, вероятно, является техническая сложность регистрации кинетики реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, носящей нестационарный характер. Далее приведен обзор основных публикаций по этой теме.

В работе [110] было изучено влияние этанола, ДМСО и формамида на кинетические параметры реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, в стационарном режиме, полученном добавлением высокой концентрации восстанавливающего агента (NADH). Присутствие органических растворителей в реакционной среде изменило кинетические параметры биoluminesцентной реакции. Было показано, что по концентрациям, приводящим к 50%-й и полной потере активности люциферазы, растворители выстраиваются в следующий ряд: формамид > ДМСО > этанол. Далее было определено, что ингибирование люциферазы различными концентрациями этих растворителей является неконкурентным по отношению к альдегиду. Было получено, что с ростом концентрации ДМСО или этанола происходит увеличение константы Михаэлиса фермента по отношению к альдегиду, в то время как для формамида наблюдалось обратное действие. Авторы сделали вывод о первичном вкладе гидрофобных взаимодействий в образование фермента-субстратного комплекса альдегида с люциферазой с увеличением концентрации ДМСО или этанола, в то время как в присутствии формамида преобладают электростатические взаимодействия.

В другой работе этих авторов [111] исследовано влияние ацетона, этанола и метанола на кинетические параметры люцифераз *P. leiognathi* и *V. harveyi* в реакции с альдегидами разной длины (октаналь C₈, деканаль C₁₀ и тетрадеканаль C₁₄). При малых концентрациях органических растворителей (0,5–18 об. %) наблюдали увеличение максимальной скорости реакции; при высоких концентрациях происходило ингибирование активности люцифераз. Степень увеличения или замедления скорости реакции зависела от вида фермента, длины альдегидной цепи и концентрации сорастворителя. Независимо от эффекта (активация или ингибирование) при со-

ответствующей концентрации органических соразтворителей константа Михаэлиса люциферазы *P. leiognathi* для S_{14} линейно увеличивалась, а для S_{12} и S_{10} – уменьшалась. По сравнению со значением K_M , определенным в отсутствие органического растворителя, 20 мМ, в присутствии 10 об.% ацетона, этанола и метанола K_M увеличилась в 4,5–5,5 и 3 раза соответственно. Для люциферазы *V. harveyi* наблюдали увеличение K_M для S_{14} и S_{10} с увеличением концентрации органического растворителя. Таким образом, добавление органических соразтворителей в реакционную среду снижало сродство люциферазы *V. harveyi* ко всем альдегидным субстратам, тогда как для люциферазы *P. leiognathi* в аналогичных условиях это наблюдалось только для S_{14} . Авторы делают вывод, что при специфическом связывании S_{14} с обеими люциферазами и S_{10} с люциферазой *V. harveyi* первичными являются гидрофобные взаимодействия, в то время как связывание люциферазой *P. leiognathi* альдегидов S_{10} и S_{12} реализуется в первую очередь через электростатические взаимодействия. Отмечается, что различия в характере связывания двух люцифераз с субстратами, вероятно, определяются структурными особенностями этих ферментов.

В работе [112] и ссылках в ней сообщается, что интенсивность биолюминесценции сопряженной ферментативной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза снижается в присутствии солей KCl, KBr и KI по мере увеличения атомного веса галогенид-аниона. Также было показано, что катионы тяжелых атомов щелочных и щелочноземельных металлов не оказывают влияния на бактериальные биолюминесцентные системы. По мнению авторов, что результат хорошо согласуется со способностью атомов галогенов усиливать спин–орбитальные взаимодействия и таким образом снижать квантовый выход (фото)люминесценции флуорофоров. То есть воздействие ионов галогенов на биолюминесцентную реакцию происходит на стадии образования и распада электронно-возбужденного интермедиата. Поэтому эффект тяжелого атома проявляется только для анионов, но не для катионов.

Анализ публикаций показывает, что влияние вязкости среды на кинетические параметры собственно реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, или на активность данного фермента, до сих пор не исследовалось. Однако кинетика сопряженной ферментативной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза в условиях повышенной вязкости среды, смоделированной добавлением глицерина и сахарозы, была изучена [113]. Авторами был сделан вывод, что глицерин и сахароза оказывают pH-зависимое ингибирующее воздействие на максимальную интенсивность свечения биферментной системы. При этом пороговая концентрация соразтворителя, снижающая интенсивность на 50% от контрольного значения, оказалась выше для глицерина. Сахароза проявляла более сильный ингибирующий эффект по сравнению с глицерином в диапазоне pH 5,8–7,8. Как глицерин, так и сахароза уменьшали константу спада свечения. Сахароза не оказывала влияния на общее количество испускаемых квантов света, в то

время как глицерин увеличивал значение данного параметра. Таким образом, в работе была продемонстрирована возможность увеличения активности сопряженной биферментной биолуминесцентной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза в вязких водно-органических смесях. Следует отметить, что влияние сред с глицерином и сахарозой на NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазу ещё не исследовано, поэтому невозможно ответить, какой именно фермент из двух сопряженных определяет наблюдавшиеся в данной работе эффекты.

1.5 Заключение к главе

В главе представлен обзор публикаций по современному состоянию проблемы: обсуждаются роль диффузии метаболитов в функционировании живых клеток, принципы измерения внутриклеточной вязкости и зависимость результатов измерения 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. Из анализа литературных данных становится понятно, что, не смотря на методологические сложности определения величины внутриклеточной вязкости, эта характеристика оказывает выраженное влияние на биохимические процессы, обеспечивающие клеточный метаболизм. Поэтому актуальной задачей является изучения особенностей функционирования в условиях повышенной вязкости ферментов со сложным кинетическим механизмом.

Бактериальная люцифераза катализирует сложный многостадийный процесс, одним из продуктов которого является видимый свет. Под действием внешних факторов может происходить нарушение баланса между скоростями стадий основного светового пути реакции и тупиковых темновых ответвлений, снижающих квантовый выход биолуминесценции. Фермент представляет собой гетеродимер и содержит вблизи активного центра функционально важную мобильную петлю, играющая роль «крышки» после связывания ферментом субстратов. Такие структурно-функциональные особенности люциферазы говорят о возможной чувствительности биолуминесцентной реакции бактерий к вязкости среды, но данный вопрос до сих пор не был исследован.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

2.1 Реактивы и оборудование

Ферменты и субстраты

Были использованы следующие ферменты: рекомбинантная люцифераза *Photobacterium leiognathi* (Лаборатория нанобиотехнологии и биолюминесценции ИБФ СО РАН), рекомбинантная люцифераза *V. harveyi* (Лаборатория фотобиологии ИБФ СО РАН), полученная по стандартной методике, описанной в [114]. Чистота препаратов составляла >90%. Для изучения влияния оксидоредуктазы на кинетику реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, использовали NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазу из *Vibrio fischeri* (Лаборатория нанобиотехнологии и биолюминесценции ИБФ СО РАН), полученную по методике, описанной в [115]. В качестве субстратов были использованы флавинмононуклеотид (Sigma-Aldrich) и деканаль (Acros Organics).

Среды с повышенной вязкостью

Среды моделировали добавлением в фосфатный буфер (pH 6,9, 0,05 М) следующих со-растворителей: этиленгликоль (Компонент-реактив), 10–30 вес.%; глицерин (Panreac), 10-40 вес.%; сорбитол (Panreac), 10-40 вес.%; глюкоза (Реахим), 10-40 вес.%; сахароза (Panreac), 10-40 вес.%; полиэтиленгликоль со средней молекулярной массой 4 кДа (PEG-4k) (Panreac), 5-15 вес.%; декстран со средней молекулярной массой 70 кДа (Dextran-70k) (Диаэм), 5-15 вес.%. Вязкости растворов этиленгликоля, глицерина, глюкозы, сорбитола и сахарозы взяли из литературных данных [116-118]. 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 частности, в [119].

Ксенобиотики

Изучали действие на реакцию, катализируемую люциферазой *P. leiognathi*, многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) (НПП «Центр нанотехнологий»), сульфата меди (II) (НПФ Невский химик) и тритиевой воды.

Основное оборудование

Кинетические измерения были выполнены методом остановленного потока на анализаторе кинетики быстрых процессов SX-20 (Applied Photophysics). Спектры поглощения компонентов регистрировали с помощью спектрофотометра Cary 5000 (Agilent Technologies). Для ин-

кубации ферментов при различных температурах использовали твердотельный термостат Гном (ДНК-технологии).

2.2 Методика экспериментов

Регистрация кинетики биолюминесценции

Кинетику биолюминесцентной реакции бактерий в нестационарном режиме регистрировали после смешивания люциферазы, 1-1,9 μM , с субстратами – восстановленным флавиномононуклеотидом FMNH₂, 30 μM , и деканалем, 20-100 μM ; оба раствора были приготовлены на основе буфера или вязкой среды. Измерения проводили при 20 °C, если не указано иное. Съемка производилась с помощью ФЭУ, расположенного непосредственно на измерительной ячейке прибора, т.е. регистрировался весь излучаемый свет, без выбора спектрального диапазона.

Получение восстановленного FMN

Восстановление FMN до FMNH₂ проводили фотохимически, освещая раствор лампой накаливания во внутреннем шприце анализатора кинетики быстрых процессов в течение 10-ти минут. Раствор содержал 0,01 М ЭДТА (ROTH) и был предварительно пробарботирован аргонном (в течение 10-ти минут) для удаления растворенного кислорода (далее по тексту – анаэробный раствор).

Регистрация кинетики неферментативного окисления FMNH₂

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.

Регистрация кинетики формирования Интермедиата II

Кинетику 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. Более подробно методика описана в [98].

Регистрация кинетики распада Интермедиата II

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.

Температурные эффекты на кинетику биолюминесцентной реакции

Температурные эффекты изучали по стандартным методикам. Кинетику биолюминесцентной реакции при температурах 5–45 °С регистрировали после 5-тиминутной инкубации реагентов при заданной температуре во внутренних шприцах анализатора. 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. Остаточную активность R (в процентах) рассчитывали согласно формуле $R = (Q^*/Q_0^*) \cdot 100$, где Q^* и Q_0^* представляют собой площади под кинетическими кривыми, полученными для фермента после термической обработки и без нее, соответственно.

Действие ксенобиотиков на реакцию, катализируемую люциферазой

Эффект ксенобиотиков изучали путём измерения кинетики биолюминесценции (как описано выше) после инкубации либо фермента, либо субстратов с ксенобиотиком. Суспензию многостенных углеродные 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 [120]. Раствор сульфата меди (II) готовили на воде. 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) [121].

Влияние оксидоредуктазы на реакцию, катализируемую люциферазой

Измеряли кинетику биолюминесценции (как описано выше) в средах с разным содержанием глицерина и сахарозы в присутствии NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы *Vibrio fischeri*. Концентрация второго фермента в реакционной смеси составляла около 0,075 U.

2.3 Обработка экспериментальных данных

Получение констант скорости по изменению поглощения флавина

Аппроксимацию кинетических кривых реакции неферментативного окисления FMNH₂, формирования пероксифлавинового интермедиата реакции (Интермедиата II) и темнового распада Интермедиата II проводили с помощью OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation). Была использована функция $D = A \cdot e^{-kt} + B$, где k – константа скорости процесса, D – значение оптической плотности при 380 или 445 нм для кинетических кривых формирования и распада Интермедиата

та II или неферментативного окисления FMNH₂. В результате были получены константы скорости k_2 , k_{dd} и k_d , соответственно.

Анализ термоинактивации бактериальной люциферазы

Константу скорости термоинактивации бактериальной люциферазы k_{in} определяли путем описания зависимости остаточной активности R от времени инкубации t функцией $R = A \cdot e^{-k_{in}t}$ с помощью OriginPro 9.0. Коэффициент детерминации для всех аппроксимаций был $R^2 > 0,96$. Энергию активации термоинактивации (E_a) рассчитывали по уравнению Аррениуса как тангенс угла наклона линейной зависимости $\ln k_{in}(1/T)$.

Математическое моделирование кинетики биolumинесцентной реакции

Для математического моделирования кинетики реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, использовали программу, разработанную 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 биolumинесценции, 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 , при которых отклонение пяти моделируемых кинетических кривых от экспериментальных минимально. Относительная ошибка моделирования кинетики биolumинесцентной реакции в буфере и вязких средах не превышала 4%.

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

3.1 Влияние вязких сред на нестационарную кинетику реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*

Как было показано в обзоре литературы (раздел 1.4), в основе биолюминесценции бактерий лежит окислительно-восстановительная флавин-зависимая реакция, катализируемая бактериальной люциферазой. Она представляет собой многостадийный процесс, сопровождающийся рядом темновых ответвлений, скорость которых также влияет на количество света, излучаемого за один оборот фермента. Для понимания молекулярных механизмов влияния различных физико-химических факторов на эту реакцию необходимо анализировать скорости отдельных стадий процесса, которые можно получить на основе данных нестационарной кинетики.

На первом этапе исследования была отработана методика регистрации нестационарной кинетики реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, получены кинетические кривые при вариации одного из субстратов (алифатического альдегида) и проанализирована зависимость эмпирических кинетических параметров от вязкости среды.

Была зарегистрирована кинетика испускания света в реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, в средах с различной концентрацией глицерина и сахарозы, используя метод остановленного потока. Концентрация фермента в экспериментах составляла около 1 μM , флавиномононуклеотида – 15 μM , а концентрацию деканала варьировали в диапазоне 10–50 μM . Было получено, что в нормальных условиях (20 °C, pH 6,9) после смешивания раствора люциферазы с раствором восстановленного флавина и альдегида интенсивность биолюминесценции достигает максимума приблизительно через 0,5 с, а затем медленно уменьшается в течение 8–10 с (Рисунок 3.1, а, б). Известно, что это является следствием быстрого окисления восстановленного флавина растворенным кислородом, поэтому происходит только один оборот фермента [98]. Такую кинетику можно описать четырьмя эмпирическими параметрами: максимальная интенсивность (I_{max}), константа спада (k_{decay}), интегральная интенсивность (Q^*) и начальная скорость реакции (v_0). k_{decay} определяют как показатель экспоненциальной функции, описывающей спад интенсивности после достижения максимума, Q^* – как площадь под кинетической кривой, а v_0 – как тангенс угла наклона начального линейного участка нарастания биолюминесценции.

Для анализа механизмов влияния вязкости на ферментативные реакции использовали полуфеноменологический подход, основанный на описании зависимости скорости элементарной биохимической стадии от вязкости среды степенной функцией с показателем δ [42], кото-

рый принимает значение от 0 до 1 и характеризует чувствительность реакции к вязкости среды (детально данный подход описан в разделе 1.2.1).

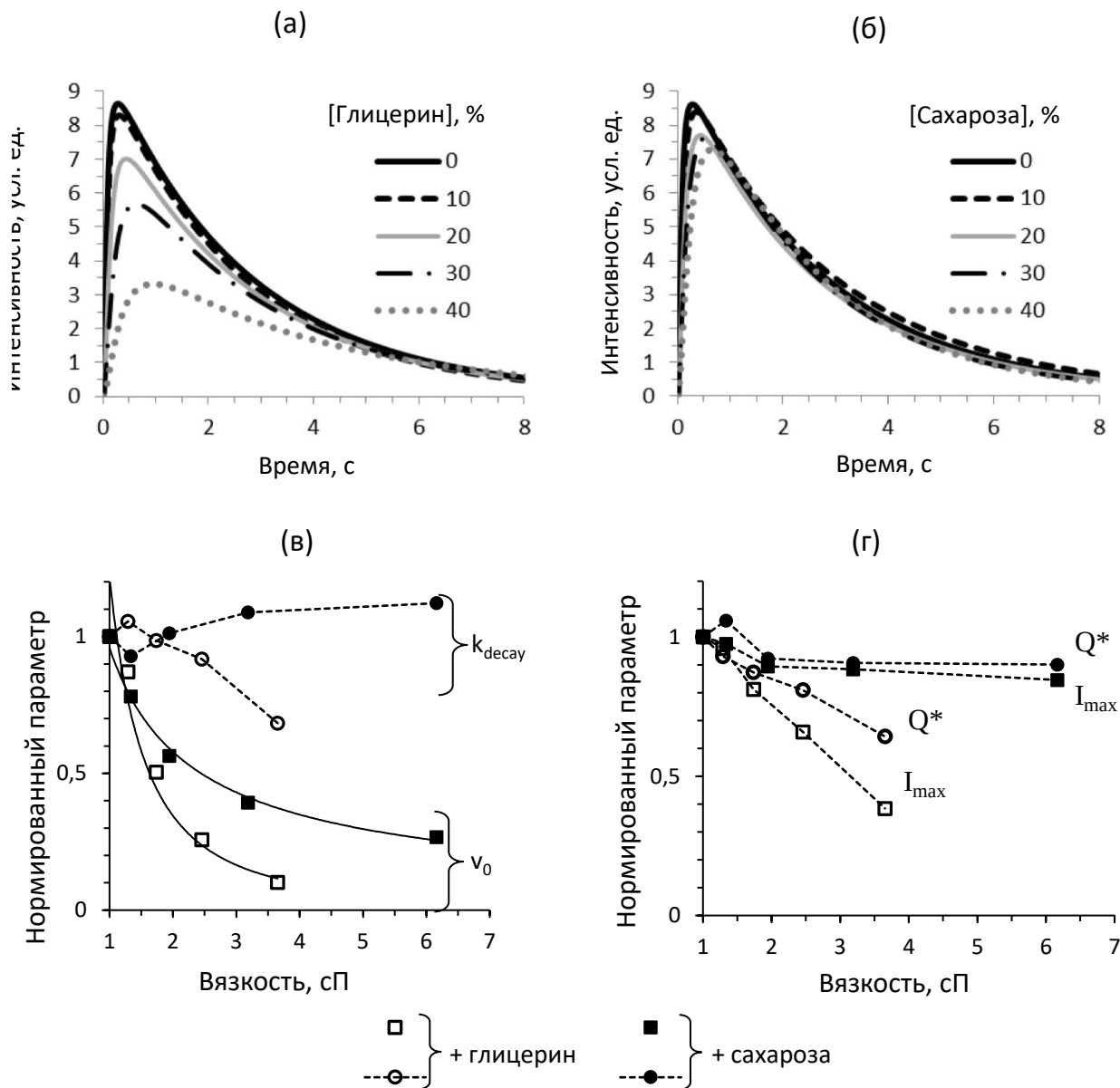


Рисунок 3.1 – Кинетические кривые биолуминесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, с 40 μ M деканала в средах с 10, 20, 30 и 40% глицерина (а) и сахарозы (б) и зависимость их характеристик от вязкости среды: константы распада k_{decay} и начальной скорости v_0 (в); максимальной интенсивности I_{max} и интегральной интенсивности Q^* (г). Параметры были нормированы на значения в буфере (вязкость 1 сП). Сплошные линии – аппроксимация степенной функцией с показателем $-0,67$ для растворов сахарозы и $-1,85$ для растворов глицерина. Пунктирные линии приведены для наглядности.

Зависимость эмпирических характеристик кинетики билюминесцентной реакции от вязкости среды для реакции с 40 μM деканала представлена на рисунке 3.1, в, г. Можно заметить, что: (i) кинетические эффекты двух соразтворителей не идентичны; (ii) среди всех параметров только начальная скорость v_0 демонстрирует степенную зависимость от вязкости, причем показатели степени различаются для сред с глицерином и сахарозой; (iii) высокие концентрации глицерина (30 и 40%), в отличие от сахарозы, вызывают уменьшение всех параметров [122].

Аналогичные данные были получены для других концентраций деканала (10, 20, 30 и 50 μM). В целом, при других концентрациях деканала кинетические параметры изменяются таким же образом, как показано на рисунке 3.1, в, г, и только для самой низкой концентрации альдегида (10 μM) картина может слегка отличаться. Эмпирические параметры Q^* , I_{max} , v_0 и k_{decay} широко используются для описания кинетики реакции бактериальной люциферазы, поскольку их легко определить. При этом надо понимать, что каждый из них является результатом некоторой комбинации скоростей отдельных элементарных стадий реакции. Чтобы понять молекулярные механизмы эффектов сред, лежащие в основе обнаруженных кинетических изменений, необходимо получить из каждой кинетической кривой скорости отдельных стадий реакции с помощью дополнительных экспериментов и методов математического моделирования. О решении данной задачи подробно рассказано в следующих разделах.

3.2 Разработка модели для описания нестационарной кинетики реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*

На следующем этапе исследования был разработан инструмент для анализа нестационарной кинетики билюминесцентной реакции бактерий и определения скоростей отдельных стадий. Первоначальной задачей было определить кинетическую схему реакции (минимальное количество кинетически различимых стадий, позволяющее описывать нестационарную кинетику реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*). Кинетический механизм билюминесцентной реакции бактерий интенсивно изучался в течение последних десятилетий [87, 94, 98, 99, 108], и в результате был предложен ряд кинетических моделей, включающих от 15-ти до 21-ой скоростных констант, о чем подробно рассказано в разделе 1.4. Следует отметить, что это делалось только для люциферазы *V. harveyi*, принадлежащей к другому структурному подсемейству, чем фермент *P. leiognathi* [83].

Основные стадии реакции, присутствующие практически во всех предложенных в литературе моделях, представлены на рисунке 3.2.

Это следующие процессы:

- 1) связывание FMNH₂ люциферазой (E) с образованием фермент-субстратного комплекса E·FMNH₂ (Интермедиат I); константа скорости стадии k_1 ;
- 2) реакция FMNH₂ с молекулярным кислородом в активном центре с образованием 4а-гидроперокси-5-гидрофлавина, E·FMNHOOH (Интермедиат II); константа скорости стадии k_2 ;
- 3) взаимодействие 4а-гидроперокси-5-гидрофлавина с альдегидом (RCOH) в активном центре с образованием с 4а-пероксиполуацеталь-5-гидрофлавин, E·FMNHOOH·RCOH (Интермедиат IIА); константы скорости прямой и обратной реакции k_3 и k_{-3} , соответственно;
- 4) разложение Интермедиата IIА на карбоновую кислоту и связанный с люциферазой электронно-возбужденный 4а-гидроксифлавин, E·FMNOH (Интермедиат III) [109]; излучательная дезактивация Интермедиата III приводит к испусканию света в диапазоне 460–530 нм; константа скорости стадии k_4 ;
- 5) в отсутствие альдегида Интермедиат II протонируется и распадается по темновому пути с образованием перекиси водорода (H₂O₂) и FMN; константа скорости стадии k_{dd} .

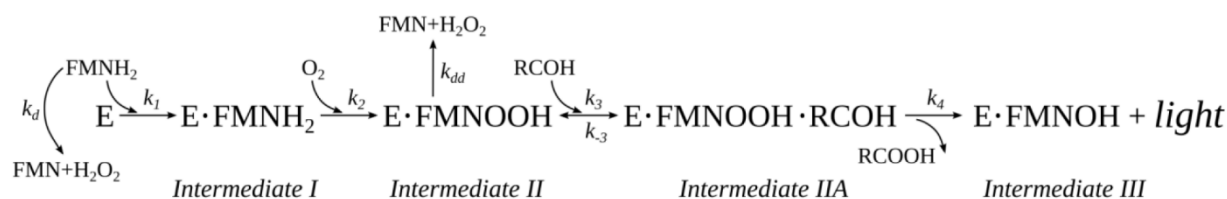


Рисунок 3.2 – Схема основных стадий реакции, катализируемой бактериальной люциферазой.

Также на схеме указан процесс окисления FMNH₂ (константа скорости k_d), приводящий к условиям, при которых фермент способен совершить лишь один оборот, независимо от стартовой концентрации субстратов.

Химические перестройки молекулы флавина в ходе реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, представлены на рисунке 1.6 в разделе 1.4.

Соответствующая данной схеме реакции система линейных дифференциальных уравнений, которая связывает концентрации фермента, субстратов, интермедиатов и константы скорости их взаимного превращения, приведена на рисунке 3.3, а. Согласно данной системе уравнений была модифицирована математическая модель в программном пакете SciLab, разработанная в лаборатории теоретической биофизики Института биофизики СО РАН (Красноярск).

(a)

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dF}{dt} = -k_1 FL - k_d F \\ \frac{dL}{dt} = -k_1 FL \\ \frac{dI_1}{dt} = k_1 FL - k_2 I_1 \\ \frac{dI_2}{dt} = k_2 I_1 - k_{dd} I_2 - k_3 I_2 A + k_{-3} I_{2A} \\ \frac{dI_{2A}}{dt} = k_3 I_2 A - k_{-3} I_{2A} - k_4 I_{2A} \\ \frac{dI_3}{dt} = k_4 I_{2A} \\ \frac{dA}{dt} = k_{-3} I_3 - k_3 I_2 A \end{array} \right.$$

Обозначения: F – FMNH₂; L – люцифераза; I_1, I_2, I_{2A}, I_3 – интермедиаты I, II, IIА и III соответственно; A – альдегид; k_1 – константа скорости связывания флавина; k_2 – константа скорости связывания кислорода; k_3 – константа скорости связывания альдегида; k_{-3} – константа скорости диссоциации I_{2A} ; k_4 – каталитическая константа; k_d – константа скорости неферментативного окисления FMNH₂; k_{dd} – константа скорости темнового распада Интермедиата II.

(б)

$$\Delta_I = \sum_5 \sum_{i=1}^N (I_{model} - I_{experiment})^2$$

(в)

$$\delta_I = \frac{\Delta_I}{N} : 5$$

(г)

$$\Delta_I = \sum_5 \sum_{i=1}^N \left| \frac{I_{model} - I_{experiment}}{I_{experiment}} \right|$$

(д)

$$\delta_I = \left(\frac{\Delta_I}{N} : 5 \right) \cdot 100\%$$

Рисунок 3.3 – Принципы работы математической модели, использованной для поиска скоростей отдельных стадий реакции: (а) система дифференциальных уравнений для моделирования нестационарной кинетики биoluminesцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*; (б) формула расчета абсолютной погрешности Δ_I и (в) формула расчета относительной погрешности (δ_I) методом наименьших квадратов во время аппроксимации кинетических кривых; (г) и (д) – формула относительной погрешности модельных кривых в условных единицах и процентах соответственно. $I_{experiment}$ и I_{model} – экспериментальное и смоделированное значение интенсивности соответственно, N – число точек.

Модель использует программу решения обыкновенных дифференциальных уравнений ode для поиска значений констант скоростей, дающих наиболее близкое описание заданных кинетических кривых биoluminesценции (представляющих собой зависимость $I_3(t)$). Качество

аппроксимации оценивается по величине абсолютной и относительной погрешности (Рисунок 3.3, б, в), последняя из которых может быть выражена в условных единицах или процентах (Рисунок 3.3, г, д). Входным набором данных для модели являются 5 кинетических кривых, измеренных при вариации концентрации одного из субстратов (альдегида). Поиск решения для каждого набора экспериментальных данных осуществляли в несколько итераций, до момента, когда погрешность моделирования не переставала меняться. Пример экспериментальных и смоделированных кинетических кривых биolumинесцентной реакции в растворе сахарозы (30%) показан на рисунке 3.4, а. Отклонение модельных кривых от экспериментальных составляло $\leq 5\%$ на большей части времени реакции (0,2–5 с) (Рисунок 3.4, б). Поэтому был сделан вывод, что разработанная модель удовлетворительно описывает кинетику биolumинесцентной реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, в нестационарных условиях.

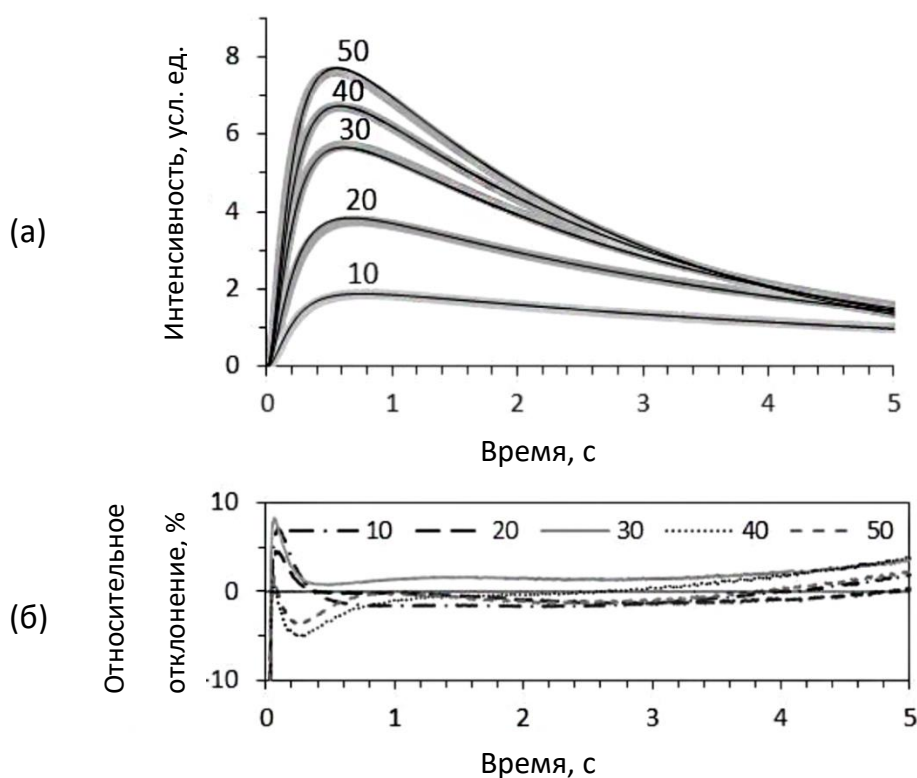


Рисунок 3.4 – (а) Кинетические кривые биolumинесценции в реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, при разных концентрациях деканала (10, 20, 30, 40 и 50 μM) в среде с 30% сахарозы: экспериментальные (серые жирные линии) и смоделированные на основе констант, указанных в таблице 3.1 (черные тонкие линии) и (б) относительное отклонение смоделированных кривых от экспериментальных.

Таким образом, было получено, что для описания экспериментальных кинетических кривых бактериальной биolumинесценции *in vitro* в средах повышенной вязкости на основе

глицерина и сахарозы достаточно семи констант скорости: k_d , k_{dd} , k_1 , k_2 , k_3 , k_{-3} , k_4 . Две из них (k_d , k_{dd}) получали из отдельных экспериментов для каждого вязкого раствора, как описано ниже, в п. 3.3. Значения k_d и k_{dd} фиксировали во время моделирования кинетики, подбирая только оставшиеся пять констант, удовлетворяющие пять экспериментальных кинетических кривых.

Следует сделать несколько важных замечаний относительно выбранной модели:

1) Выбор «минимальной» схемы реакции был основан на апробировании других, более сложных, схем, т.к. исходно при создании модели как образец кинетического механизма использовали модель для реакции люциферазы *V. harveyi* [98]. В частности, было проведено тестирование моделей, включавших такие стадии как обратимое связывание флавина люциферазой, изомеризация люциферазы после связывания флавина, связывание субстратов в другом порядке и формирование пероксилфлавина из данного интермедиата, стадия превращения связанного альдегида в кислоту. Было получено, что в этих схемах количество моделируемых параметров избыточно для описания экспериментальных кинетических кривых, что приводит к невозможности нахождения однозначного решения системы уравнений.

2) Выбранная кинетическая модель предполагает необратимость первой стадии реакции (образования Интермедиата I, Рисунок 3.2). При этом известно, что флавин может обратно диссоциировать. Для люциферазы *V. harveyi* константа скорости этого процесса была оценена как 1200 с^{-1} [98]. В нашем предварительном моделировании с включением обратимости первой стадии с константой скорости k_{-1} , было установлено, что k_{-1} может принимать значения от 300 до 2000 с^{-1} без влияния на другие константы и качество аппроксимации, как в буфере, так и в вязких средах. Наиболее вероятной причиной этого является высокая скорость следующей стадии реакции (k_2), что делает первую стадию реакции практически необратимой. На основании этого, мы исключили константу скорости диссоциации Интермедиата I из окончательной кинетической модели.

3) Полученная для люциферазы *P. leiognathi* минимальная кинетическая модель включает всего 7 скоростных констант, что в два раза меньше по сравнению с самой простой моделью для люциферазы *V. harveyi*. При этом две из семи констант фиксируются при моделировании, что значительно упрощает интерпретацию полученных результатов.

Таким образом, в результате выполнения данного этапа исследования была предложена кинетическая модель реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, на основе подхода, аналогичного тому, как это было сделано ранее для люциферазы *V. harveyi* [98]. Известно, что несмотря на схожий механизм реакции, эти две люциферазы различаются по кинетическим характеристикам: фермент из *P. leiognathi* относят к «быстрым», а из *V. harveyi* – «медленным» ферментам [83]. Было получено, что достаточная для аппроксимации кинетических кривых биолюминесценции модель для люциферазы *P. leiognathi* включает в себя меньшее

количество стадий, чем модель для *V. harveyi*, опубликованная ранее [98]. Отличительными чертами предложенной кинетической модели реакции люциферазы *P. leiognathi* являются: (i) необратимость стадии связывания фавина люциферазой и объединение её с последующей стадией изомеризации фермента; (ii) объединение нескольких стадий после связывания альдегида в одну заключительную стадию с константой скорости k_4 . Тем не менее, эта упрощенная модель с семью константами скорости (две из которых могут быть определены в дополнительных экспериментах и зафиксированы во время моделирования) позволила нам аппроксимировать экспериментальные кинетические кривые с относительной погрешностью <4 % и впоследствии получить зависимость скорости основных стадий реакции от вязкости сред. Расширение модели дополнительными стадиями не приводило к улучшению качества аппроксимации кинетических кривых.

3.3 Эффект вязких сред на элементарные стадии реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*

Влияние вязкости на кинетику неферментативного окисления FMNH₂

Для анализа эффектов вязких сред на отдельные стадии биolumинесцентной реакции с помощью математической модели было важно минимизировать количество параметров, оптимизируемых во время моделирования. Поэтому некоторые константы скоростей, такие как для реакций окисления восстановленного флавина (k_d), формирования и распада пероксифлавина (k_2 и k_{dd}), были получены из дополнительных экспериментов и в дальнейшем при математическом моделировании кинетики реакции использовались в виде фиксированных параметров.

Кинетические кривые окисления FMNH₂ в вязких средах были получены методом остановленного потока путём измерения оптической плотности при длине волны 445 нм, D_{445} . Значения оптической плотности в каждый момент времени были переведены в долю окисленной формы флавина в образце, что позволило унифицировать кинетические кривые для разных сред (Рисунок 3.5, а, б). Видно, что в вязких средах наблюдается замедление скорости реакции. Аппроксимацией экспериментальных кривых экспоненциальной функцией были получены константы скорости окисления FMNH₂, k_d , в средах с глицерином и сахарозой (Рисунок 3.5, в). Вязкостная зависимость этой константы описывается степенной функцией с показателем $-0,81$.

Вообще, кинетика неферментативного окисления восстановленного флавина с участием растворенного кислорода, которое является сложным многостадийным процессом, может быть аппроксимирована суммой двух экспонент. Одна из функций имеет показатель около 7 с^{-1} в буфере при 20 °C и характеризует скорость уменьшения концентрации восстановленного флавина [98].

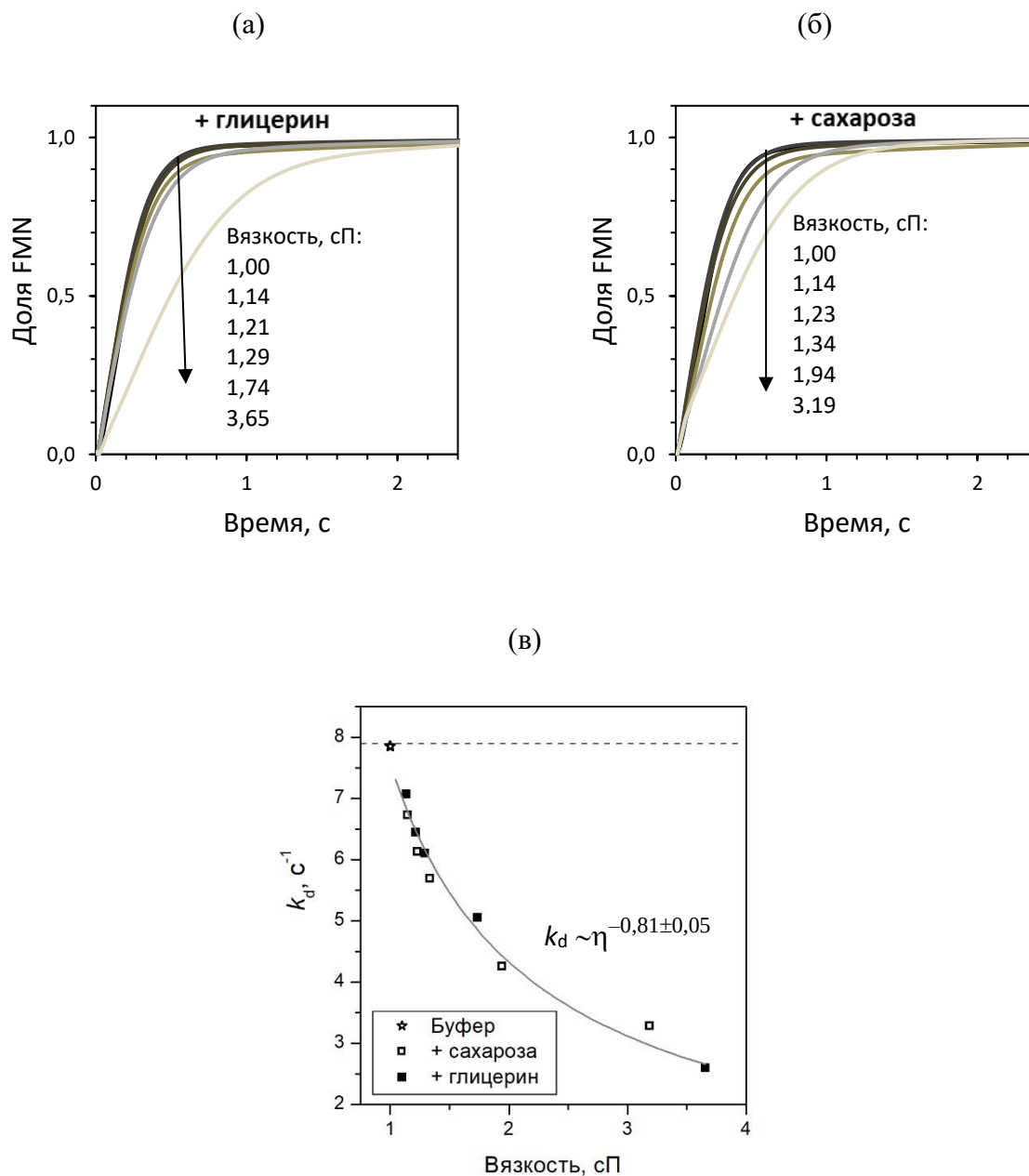


Рисунок 3.5 – Кинетические кривые неферментативного окисления FMNH₂ в средах с глицерином (а) и сахарозой (б); зависимость полученной на их основе константы скорости от вязкости раствора (в). Линией представлена аппроксимация степенной функцией с указанным показателем. k_d – константа скорости неферментативного окисления FMNH₂; η – вязкость [123].

Влияние вязкости на скорость темнового распада Интермедиата II

Были получены кинетические кривые для реакции темнового распада 4а-гидропероксифлавина в составе Интермедиата II в вязких средах. Концентрации сахарозы или глицерина в измерительной ячейке составляли 0, 5, 7.5, 10, 20, 30 и 40 %. (Рисунок 3.6, а).

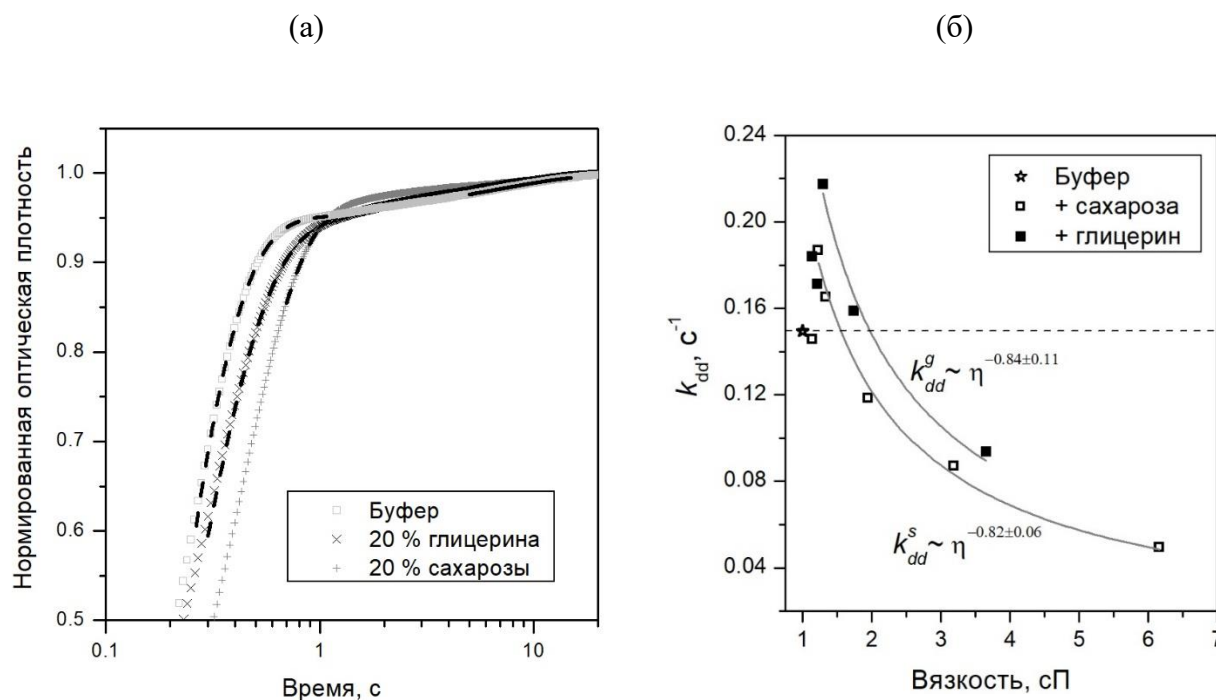


Рисунок 3.6 – Кинетика распада Интермедиата II в вязких средах: (а) изменение оптической плотности при 445 нм (в полулогарифмических координатах); штриховой линией показана аппроксимация кинетики неферментативного окисления FMNH₂ (участок 0,3-1,0 с), сплошной линией – реакции распада пероксифлавинового интермедиата (участок 5-15 с); аппроксимации проводили экспоненциальной функцией; (б) зависимость k_{dd} от вязкости среды. Линии на (б) отражают аппроксимацию данных степенной функцией с указанными показателями (индексы s и g обозначают сахарозу и глицерин соответственно). Горизонтальная штриховая линия указывает значение константы скорости для буферного раствора (контроль) [123].

Описание кинетики в диапазоне 5-15 экспоненциальной функцией позволило установить влияние вязкости на константу скорости данного процесса k_{dd} (Рисунок 3.6, б). Было получено, что k_{dd} возрастает при низких концентрациях сахарозы и глицерина, по сравнению со значением в буфере. Максимальная нестабильность интермедиата наблюдается в средах с вязкостью около 1,3 сП, при этом скорость распада увеличивается на 20 и 47% в присутствии сахарозы и глицерина соответственно. При дальнейшем росте вязкости k_{dd} снижается аналогично k_d (Рисунок 3.5, в).

На рисунке 3.6, б, видно, что зависимость k_{dd} от вязкости в диапазоне 1,3–6,0 сП описывается степенной функцией с показателями $-0,82$ и $-0,84$, что говорит о высокой степени сопряжения активного центра фермента со средой и характеризует реакцию распада интермедиата как процесс, близкий к диффузионно-контролируемому ($\delta = 1$) [42]. Примечательно, что скорость окисления FMNH₂ k_d снижается с ростом вязкости также с показателем $\delta = 0,81 \pm 0,05$

(Рисунок 3.5, в). Этот химический процесс происходит без участия фермента и зависит от диффузии растворенного O_2 и $FMNH_2$ в среде. Близость значений δ для растворов сахарозы и глицерина указывает на сходство механизмов действия сред, независимо от химической структуры вязкого агента. Это свидетельствует об отсутствии специфических взаимодействий ко-сольвентов с восстановленным флавином и о диффузионном контроле данной реакции.

Снижение скорости темнового распада Интермедиата II при вязкости $>1,3$ сП может быть объяснено затрудненной диффузией продуктов – FMN и H_2O_2 , что сдвигает равновесие реакции диссоциации в сторону исходных веществ, то есть стабилизирует Интермедиат II. Примеры диффузионного контроля реакций диссоциации известны [124]. Возможный механизм эффекта дестабилизации Интермедиата II при низких концентрациях глицерина и сахарозы был установлен на основе молекулярной динамики люциферазы в присутствии этих сорастворителей [123]. В частности, получено, что в присутствии 5 и 10% глицерина и сахарозы изменяется подвижность (среднеквадратичная флуктуация, RMSF) атомов в активном центре фермента, участвующих в связывании флавина. Такие изменения могут приводить к ослаблению связывания ферментом субстрата ($FMNH_2$) и/или 4а-гидропероксифлавина, что в итоге усиливает темновой распад последнего.

Полученные результаты говорят о том, что эффект вязких сред на стабильность Интермедиата II реакции является результатом двух разнонаправленных процессов: с одной стороны, происходит дестабилизации 4а-пероксифлавина за счет взаимодействия аминокислотных остатков белка с молекулами вязкого агента и, напротив, наблюдается стабилизации этого интермедиата за счет снижения скорости диффузии продуктов его распада. Наблюдаемый механизм замедления темнового пути биолюминесцентной реакции за счет диффузионных затруднений продуктов распада ключевого интермедиата может быть реализован и во внутриклеточных условиях, поскольку люцифераза работает в окружении других ферментов и вспомогательных белков, закодированных в *lux*-опероне [125]. Таким образом, полученный результат позволяет предположить, что, повышенная микровязкость служит фактором, не только защищающим люциферазу, как и другие белки, от термоинактивации, но, вероятно, и повышающим квантовый выход биолюминесцентной реакции. Также изменение вязкости внутри клетки может быть механизмом (регулятором) переключения реакции со светового пути на темновой.

Кинетика формирования Интермедиата II реакции

Кинетику формирования Интермедиата II реакции регистрировали методом остановленного потока по изменению оптической плотности при 380 нм. Для этого смешивали анаэробный раствор Интермедиата I с буфером, уравновешенным с атмосферным воздухом. Интермедиат I получали добавлением люциферазы в анаэробный раствор $FMNH_2$.

Пример кинетической кривой реакции в невязкой среде (буфер, 1 сП) приведен на рисунке 3.7. Видно, что формирование Интермедиата II завершается в течение 15 мс и может быть описано константой скорости псевдо-первого порядка. Константа скорости процесса была оценена как $k_2 = 400 \text{ с}^{-1}$. Однако, экспериментально определить значение k_2 для растворов глицерина или сахарозы оказалось невозможным из-за сильного искажения оптического сигнала соразтворителями в течение первых 50 мс после смешивания. Поэтому найденное значение константы скорости в буфере использовали в качестве начального значения k_2 для моделирования кинетики в вязких средах.

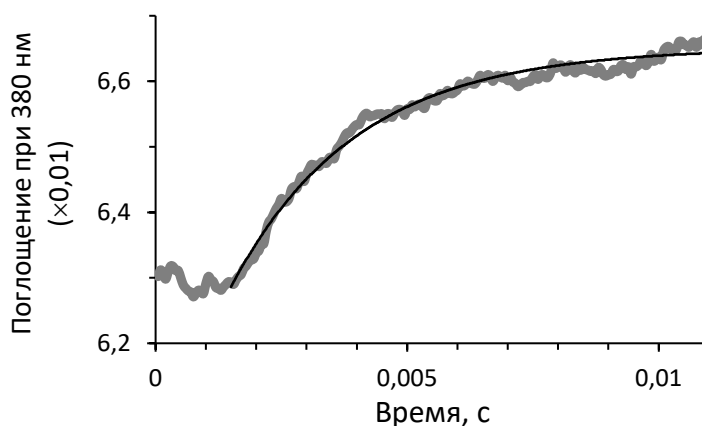


Рисунок 3.7– Изменение оптической плотности при 380 нм в ходе образования интермедиата II в буфере: экспериментальная кинетическая кривая (серая жирная линия) и аппроксимация функцией $D_{380} = A \cdot e^{-k_2 t} + B$ (черная тонкая линия). k_2 – константа скорости образования Интермедиата II [126].

Влияние вязкости среды на связывание люциферазой субстратов и образование электронно-возбужденного интермедиата реакции

Для определения констант скоростей стадий связывания субстратов (k_1 , k_3 , k_{-3}) и формирования и распада электронно-возбужденного Интермедиата III (k_4) в реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, в вязких средах было проведено математическое моделирование кинетических кривых, согласно подхода, описанного в п. 3.2. Одновременно моделировали кинетические кривые, полученные для пяти концентраций альдегида (10, 20, 30, 40 и 50 μM). Константы скоростей k_d и k_{dd} были зафиксированы в ходе поиска решений. Все вычисленные константы скоростей отдельных стадий реакции в вязких средах с глицерином и сахарозой приведены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Константы скорости отдельных стадий реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, в вязких средах [126]

Константа скорости *	Значение в разных средах						−δ&
	Буфер	Сорастворитель	Концентрация, %				
			10	20	30	40	
k _d , с ^{−1}	7,85	Глицерин	7,50	5,05	3,66	2,60	0,81±0,05
		Сахароза	5,69	4,25	3,29	2,64	
k _{dd} , с ^{−1}	0,15	Глицерин	0,15	0,15	0,12	0,10	0,84±0,11
		Сахароза	0,15	0,12	0,09	0,05	0,82±0,06
k ₁ , М ^{−1} с ^{−1}	1,55	Глицерин	1,06	0,62	0,38	0,19	1,62±0,04
		Сахароза	1,21	0,82	0,47	0,29	0,94±0,03
k ₂ , с ^{−1}	400	Глицерин	398	403	403	395	N/A
		Сахароза	401	403	393	402	N/A
k ₃ , М ^{−1} с ^{−1}	0,42	Глицерин	0,53	0,30	0,21	0,1	1,21±0,35
		Сахароза	0,31	0,18	0,06	0,02	1,95±0,15
k _{−3} , с ^{−1}	10,90	Глицерин	8,95	7,50	5,42	5,30	0,59±0,07
		Сахароза	7,02	9,07	9,40	4,67	N/A
k ₄ , с ^{−1}	0,46	Глицерин	0,45	0,47	0,43	0,42	N/A
		Сахароза	0,38	0,64	1,69	5,13	N/A

*Константы обозначены в соответствии с рисунком 3.2. Значения k_d и k_{dd} были зафиксированы во время моделирования. Значения k_{dd} для 30% глицерина были получены путем интерполяции. $^{\&}\delta$ – показатель степенной зависимости. N/A означает отсутствие степенной зависимости.

На рисунке 3.8, а, представлена зависимость от вязкости среды скорости связывания люциферазой восстановленного флавина (k_1) в средах с глицерином и сахарозой. Можно видеть, что эти зависимости удовлетворительно описываются степенной функцией. При этом показатель степени говорит о том, что в растворе сахарозы связывание FMNH₂ – диффузионно-контролируемый процесс ($\delta = -0,94$), однако, в случае растворов глицерина наблюдается усиленный эффект ($\delta = -1,62$).

Влияние растворов сахарозы и глицерина на константу скорости образования 4а-гидропероксифлавина, k_2 , отражено на рисунке 3.8, б. Значения k_2 были получены в результате моделировании кинетики от начального значения 400 с⁻¹. Данные свидетельствуют о том, что эта стадия реакции не чувствительна к вязкости в использованных условиях эксперимента. Ранее, для люциферазы *Vibrio harveyi*, было установлено, что образование 4а-

гидропероксифлавина протекает намного медленнее, когда фермент смешивают со свободным FMNH⁻ в растворе, насыщенном воздухом [98]. Это означает, что связывание свободного FMNH⁻ с люциферазой (образование Интермедиата I) является лимитирующей стадией. Таким образом, в использованных нами условиях нельзя сделать однозначный вывод о влиянии сахаразы и глицерина на k_2 , поскольку эта стадия не является скоростью-лимитирующей.

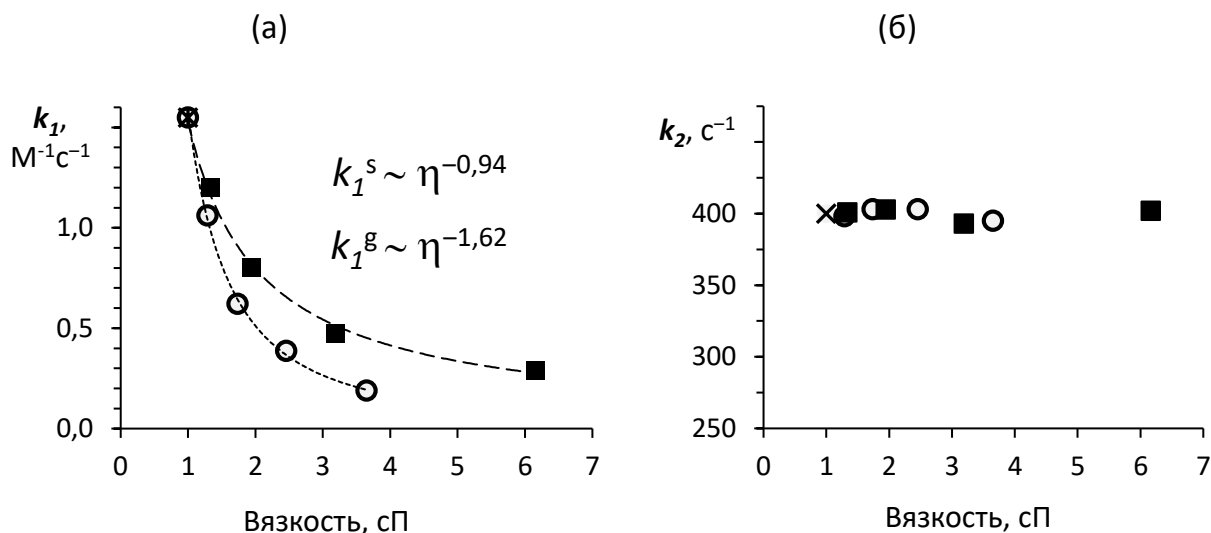


Рисунок 3.8 – Зависимость констант скорости связывания восстановленного флавинмоноклеотида k_1 (а) и образования Интермедиата II k_2 (б) от вязкости среды для растворов глицерина (пустые маркеры $\circ$) и сахаразы (заполненные маркеры $\blacksquare$). Пунктирные линии представляют аппроксимацию степенной функцией с указанными показателями. $\times$ указывает на значение в буферном растворе. Верхние индексы g и s обозначают глицерин и сахарозу, соответственно [126].

Математическое моделирование выявило сильное влияние вязкости на связывание альдегида (образование Интермедиата IIА), но не на его обратную диссоциацию (распад Интермедиата IIА), как показано на рисунке 3.9. Степенная зависимость константы скорости связывания альдегида k_3 от вязкости характеризуется показателями $-1,86$ и $-1,21$ для сред с сахарозой и глицерином, соответственно. Такие значения указывают на то, что дополнительные факторы усиливают значительное диффузионное ограничение (например, взаимодействие соразтворителя с белком и субстратом и/или изменение внутренней динамики белка).

Конечной химической стадией реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, является образование и дезактивация электронно-возбужденного интермедиата, который, как предполагается, представляет собой связанный с ферментом 4а-гидроксифлавин (k_4 на рисунке 3.2) [109]. Скорость этой стадии можно рассматривать как меру каталитической активности

фермента, поскольку она отражает способность люциферазы производить свет как продукт реакции. Зависимость k_4 от вязкости среды показана на рисунке 3.10.

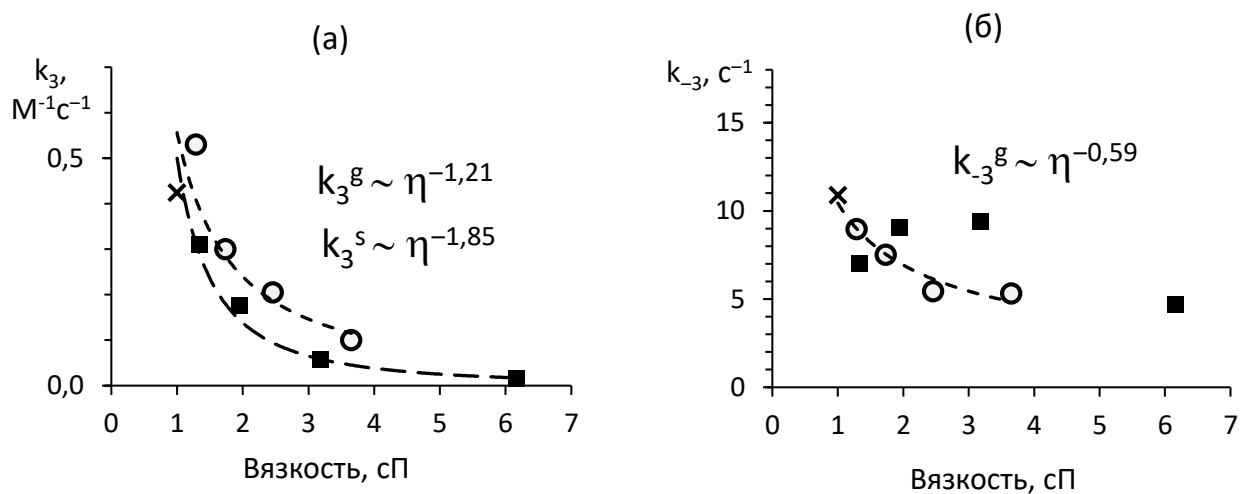


Рисунок 3.9 – Зависимость констант скорости связывания деканала (а) и его диссоциации (б) от вязкости для растворов глицерина (пустые маркеры $\circ$) и сахарозы (заполненные маркеры $\blacksquare$). Пунктирные линии представляют аппроксимацию степенной функцией с указанными показателями. $\times$ указывает значение константы в буферном растворе. Верхние индексы g и s обозначают глицерин и сахарозу, соответственно [126].

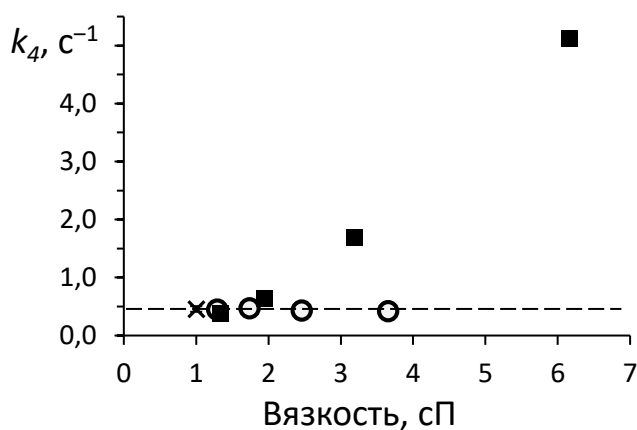


Рисунок 3.10 – Зависимость каталитической константы бактериальной люциферазы (k_4) от вязкости для растворов глицерина (пустые маркеры $\circ$) и сахарозы (заполненные маркеры $\blacksquare$). Пунктирная линия указывает значение в буферном растворе, отмеченное $\times$ [126].

Получено, что действие двух вязких соразтворителей на k_4 различно: сахароза увеличивает эту скорость, в то время как в присутствии глицерина она остается такой же, как в буфере. Такая зависимость говорит об отсутствии влияния вязкости среды как таковой на скорость каталитического акта в полости люциферазы. Причиной различного влияния соразтворителей на

каталитическую константу люциферазы может быть специфическое воздействие сахарозы на локальную структуру или динамику активного центра фермента. Эта гипотеза была проверена с помощью анализа молекулярной динамики белка в окружении разных концентраций глицерина и сахарозы, результаты которого подробно описаны в статье [126]. В частности, было показано, что (i) в присутствии сахарозы изменяется конформация боковых цепей αGlu175 , αSer176 , участвующих в связывании флавина, (ii) αTyr110 , αTrp194 , αTrp250 , αTyr251 и αTyr254 , предположительно расположенные в области связывания альдегида, образуют, в основном нестабильные, водородные связи с глицерином, но только два последних из них – с сахарозой, (iii) 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.

Таким образом, анализ кинетических кривых с помощью математической модели показал, что для реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, связывание субстратов является контролируемой диффузией стадией (k_1 , k_3), тогда как каталитическая константа фермента (k_4) не зависит от вязкости среды.

3.4 Совокупное влияние на кинетические и каталитические характеристики биolumинесцентной реакции бактерий вязких сред с глицерином и сахарозой

Полученные данные по константам скоростей отдельных стадий реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, показали, что помимо общего замедления кинетики реакции (которое может быть результатом диффузионного контроля некоторых стадий), среды оказывают также специфическое действие на каталитическую активность фермента. Различие во влиянии двух соразтворителей проявляется в зависимости эмпирических параметров биolumинесцентной реакции ($I_{\max}$, k_{decay} , Q^* , v_0) от вязкости. Например, при увеличении концентрации глицерина наблюдается постепенное уменьшение максимальной интенсивности ($I_{\max}$) и скорости спада люминесценции (k_{decay}); однако, в присутствии сахарозы эти параметры остаются примерно на контрольном уровне (Рисунок 3.1, в, г). Регистрируемая в нестационарном режиме интегральная интенсивность Q^* считается линейно пропорциональной максимальной интенсивности ($\sim I_{\max}$) и обратно пропорциональной константе спада ($\sim 1/k_{\text{decay}}$) [108]. Но в случае растворов глицерина Q^* коррелирует с первым параметром, но не с последним. Ранее было показано, что k_{decay} зависит от скорости темнового распада Интермедиата II (k_{dd}), каталитической константы (k_4), константы ассоциации альдегида ($K_a = k_3/k_{-3}$) и концентрации альдегида А [108]:

$$k_{\text{decay}} = \frac{k_{dd} + k_4 \cdot K_a \cdot A}{1 + K_a \cdot A}. \quad (29)$$

Наши данные показывают, что влияние глицерина и сахарозы на скорости некоторых из этих элементарных стадий реакции различно, что обуславливает разное влияние сред на наблюдаемую k_{decay} .

В целом, мы получили, что подобно стадиям с константами скорости k_d и k_{dd} , стадии связывания субстратов (k_1 , k_3) являются диффузионно контролируруемыми. Это подтверждается тем фактом, что зависимость этих констант скорости от вязкости среды соответствует степенной функции с показателем $\delta \geq 1$ (Таблица 3.1). Было установлено, что в присутствии сахарозы связывание фавина (k_1) соответствует контролируемому диффузией процессу ($\delta \approx 1$), тогда как в растворах глицерина наблюдается усиление эффекта ($\delta > 1$). Также мы получили, что на стадию связывания альдегида (k_3) вязкость обеих сред оказывает сильное влияние (Рисунок 3.9, а) (таблица 3.1, $\delta = -1,21$ и $-1,85$). Специфические взаимодействия между молекулами соразтворителей и аминокислотными остатками, участвующими в связывании субстратов, могут быть тем механизмом, который усиливает замедление этих стадий в вязких средах. И действительно, результаты моделирования молекулярной динамики люциферазы в окружении соразтворителей, полученные нашими коллегами, показали, что глицерин, в отличие от сахарозы, может проникать в активный центр и образовывать водородные связи с αGlu43 (расположенным на дне каталитической полости и участвующим в связывании флавина) и с αTrp194 (расположенным на входе в каталитическую полость и предположительно участвующим в связывании альдегида) [126]. Также можно предположить и другие механизмы взаимодействий соразтворителей с субстратами и белком. Например, водородная связь между альдегидом и молекулами соразтворителя может привести к увеличению эффективного гидродинамического радиуса этого субстрата, что усугубляет затруднение диффузии в вязких средах. Стоит отметить, что используемые растворы с более высокой вязкостью также имеют более низкую полярность по сравнению с буфером. В менее полярной среде субстраты могут изменить свою предпочтительную структурную конформацию, что повлияет на скорость диффузии. Это особенно актуально для алифатического альдегида, который является гидрофобным соединением. Молекулы соразтворителя также могут снижать ферментативную активность, блокируя доступ альдегида к активному центру. Другой возможный механизм эффекта повышенной вязкости – это влияние на внутреннюю релаксацию интермедиатов, вклад которой в общую скорость реакции незначителен в буфере, но может стать значительным в присутствии глицерина и сахарозы. Известно, что снижение внутримолекулярной динамики белка может замедлять образование фермент-субстратного комплекса [127].

Мы получили, что зависимость скорости диссоциации альдегида (k_{-3}) от вязкости среды не демонстрирует диффузионный контроль. Не было обнаружено зависимости от вязкости раствора скорости связывания кислорода с Интермедиатом I (k_2) (Рисунок 3.8, б). Полученное значение k_2 (400 c^{-1}) оказалось близко к опубликованному ранее значению для реакции люциферазы *V. harveyi* в буфере [98]. Авторы [98] показали, что скорость связывания кислорода Интермедиатом I зависит от концентрации кислорода, то есть это процесс второго порядка. Однако в нашей работе мы используем значение константы псевдо-первого порядка, поскольку все эксперименты проводились при высоких концентрациях кислорода (около $120 \text{ }\mu\text{M}$) по сравнению с концентрациями других реагентов ($0,9\text{--}50 \text{ }\mu\text{M}$). Дополнительная проверка уровня растворенного кислорода в использованных растворах глицерина и сахарозы подтвердила, что он близок к его концентрации в буфере. Отсутствие диффузионного ограничения для k_2 , полученное в нашей работе, может быть результатом высокого сродства бактериальной люциферазы к кислороду [98, 87]. Таким образом, k_2 не является скоростью лимитирующей стадией реакции ни во время начальной фазы реакции (подъем), ни во время завершающей стадии (спад свечения).

Наиболее заметное различие действий глицерина и сахарозы на реакцию было обнаружено в эффектах на скорость образования электронно-возбужденного интермедиата k_4 (Рисунок 3.10). Сахароза способствует увеличению k_4 , в то время как глицерин не оказывает никакого эффекта. Хотя известно, что многие соразтворители являются стабилизаторами, случаи активации ими ферментативных реакций редки. Увеличение константы скорости ферментативного катализа, вызванное соразтворителями, можно объяснить разными механизмами. Например, была показана роль сдвига диэлектрической проницаемости среды в присутствии глицерина или сахарозы [128] или участие нуклеофильного соразтворителя в качестве реагента в реакции гидролитических ферментов [129]. Для реакции, катализируемой бутирилхолинэстеразой, в растворе сахарозы было установлено, что сахароза исключается из полости активного центра и действует как полупроницаемая мембрана на ее входе. Это взаимодействие белок-соразтворитель вызывает осмотический стресс, который приводит к переносу молекул воды из полости активного центра в объемный раствор [130]. Данный эффект также может иметь место при взаимодействии сахарозы с бактериальной люциферазой, потому что при помощи молекулярной динамики было показано, что сахароза не может попасть в каталитическую полость фермента. Изменение гидратации в активном центре люциферазы может вызвать перестройку водородных связей, что имеет решающее значение для стабилизации Интермедиата IIА [131].

Сравнение изменений эмпирических параметров кинетики реакции (v_0 , k_{decay} , I_{max} и Q^* , Рисунок 3.1, в, г) и индивидуальных констант скоростей, определенных в отдельных экспериментах и моделированием (k_d , k_{dd} , k_1 , k_3 , k_{-3} и k_4 , рисунки 3.5, 3.6, 3.8–3.10) выявили некоторые

закономерности. В частности, начальная скорость реакции (v_0) ведет себя как диффузионно контролируемый процесс, подобно стадии связывания фавина (k_1).

Один из основных вопросов, рассмотренных в исследовании, заключается в том, изменяется ли повышенная вязкость среды равновесие между «световыми» и «темным» путями биолюминесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой. Известно, что квантовый выход этой реакции в буфере составляет 10–16% [81], т.е. только 1-2 из десяти молекул люциферазы производят квант света в реакции. Результаты показали, что присутствие соразтворителей снижает скорость темновых процессов (k_d , k_{dd}), но константы скорости связывания субстратов при этом также снижаются (k_1 , k_3). Соотношение между показателями δ в вязкостно-зависимостях «световых» и «темновых» стадий (Таблица 3.1) указывает на то, наблюдаемая интегральная интенсивность зависит не только от замедления связывания субстратов. Возможный вывод заключается в том, что значительный вклад в эффективность реакции также вносит каталитическая константа k_4 , значения которой могут увеличиваться в присутствии соразтворителей.

В целом, анализ функционирования бактериальной люциферазы в растворах с глицерином и сахарозой показал, что в дополнение к общему эффекту диффузионного контроля связывания субстратов могут присутствовать некие специфические воздействия на каталитическую константу фермента k_4 . Применение методов молекулярной динамики позволило пролить свет на механизмы, лежащие в основе различного воздействия глицерина и сахарозы [122, 123, 126, 132]. В частности, было показано, что значительных конформационных изменений бактериальной люциферазы в растворах сахарозы или глицерина не происходит, однако, при низкой концентрации соразтворителей ($\leq 10\%$) функционально важная мобильная петля фермента демонстрирует более высокую подвижность [122]. Также было оценено количество молекул воды и соразтворителя в активном центре бактериальной люциферазы и обнаружено, что в каталитическую полость могут попадать молекулы глицерина, но не сахарозы [122]. Это подтвердил также анализ водородных связей. Было показано, что в то время как молекулы сахарозы могут образовывать водородные связи только с остатками, расположенными на входе в активный центр, глицерин может проникать в более глубокие области каталитической полости [126].

Различия в эффектах глицерина и сахарозы на функционирование ферментов были продемонстрированы неоднократно: для бутирилхолинэстеразы [13], синтазы жирных кислот [133], карбоксипептидазы-A [134] и H^+ -АТФазы [135]. Чаще всего предполагается, что это связано с молекулярным размером соразтворителей. Меньшие по размеру молекулы глицерина могут проникать ближе к каталитически важным сайтам белка и, вероятно, блокировать группы, ответственные за правильное связывание субстрата, в то время как сахароза достаточно велика, чтобы быть исключенной из активного центра [130, 136].

3.5 Заключение к главе

Были изучены механизмы, лежащие в основе влияния вязких сред с глицерином и сахарозой на биолюминесцентную реакцию, катализируемую бактериальной люциферазой. Выявленные изменения кинетики реакции указывают на то, что помимо вязкости раствора вклад в влияние среды вносят дополнительные характеристики соразтворителя: несмотря на замедление кинетики испускания света в присутствии обоих соразтворителей, глицерин вызывал заметное снижение максимальной скорости реакции и интегральной интенсивности, в то время как эффекты сахарозы были слабыми. Для раскрытия механизмов, ответственных за наблюдаемые эффекты было проанализировано изменение констант скоростей отдельных стадий реакции. С этой целью была разработана и использована математическая модель, описывающую кинетику светового излучения в ходе люциферазной реакции. Результаты моделирования показали, что связывание восстановленного флавина (формирование Интермедиата I) и альдегида (формирование Интермедиата IIА) происходит в диффузионно-контролируемой манере, а взаимодействие комплекса люцифераза-флаavin с кислородом (формация Интермедиата II) не зависит от диффузии, вероятно, из-за относительно низкой скорости связывания флавина и высокой скорости диффузии кислорода по сравнению с флавином. Несмотря на замедление с ростом вязкости таких конкурирующих стадий реакции, как автоокисление флавина и распад пероксифлавинового интермедиата, повышенная вязкость не дает кинетических преимуществ для светоизлучающего пути реакции.

Основное различие между двумя соразтворителями было обнаружено во влиянии на константу скорости образования возбужденного интермедиата (Интермедиат III): присутствие сахарозы увеличивает каталитическую константу до 5-ти раз, в то время как в глицерине она остается неизменной. Таким образом, глицерин не влияет на каталитическую константу бактериальной люциферазы, при этом замедляя 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 такого различия действий двух соразтворителей 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. Для разделения общих и специфических эффектов вязких требуется расширить спектр соразтворителей.

ГЛАВА 4. Зависимость кинетических свойств бактериальной люциферазы в вязких средах от физико-химических характеристик соразтворителей

4.1 Влияние соразтворителей различных молекулярных размеров на отдельные стадии реакции, катализируемой бактериальной люциферазой

Результаты исследования кинетики реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, в вязких средах с глицерином и сахарозой, описанные в предыдущей главе, указывают на то, что важным фактором, определяющим эффект соразтворителей, является их способность проникать в активный центр фермента. Эта способность связана напрямую с молекулярным размером соразтворителя. Чтобы проверить эту гипотезу, мы, используя разработанную методику, дополнительно изучили кинетику реакции в средах с различными концентрациями этиленгликоля, глюкозы, сорбитола, полиэтиленгликоля (PEG) и декстрана. Молекулярная масса этих веществ составляет 62, 180, 182, ~4 000 и ~70 000 соответственно. Вместе с глицерином и сахарозой, изученными ранее, (молекулярная масса 92 и 342, соответственно) мы получили линейку соразтворителей с изменяющимся молекулярным размером, в которой присутствуют многоатомные спирты (этиленгликоль, глицерин, сорбитол и PEG) и сахараиды (глюкоза, сахароза и декстран). Химическая структура полного набора соразтворителей приведена на рисунке 4.1, а их физико-химические характеристики – в таблице 4.1.

Влияние соразтворителей на реакцию, катализируемую бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, изучали с помощью подхода, описанного в главе 3. В частности, сначала в вязких средах были получены константы скоростей автоокисления восстановленного флавина (k_d) и темнового распада Интермедиата II (k_{dd}), а потом при помощи математической модели были проанализированы кинетические кривые биолюминесценции в этих средах.

Кинетика неферментативного окисления FMNH₂ в присутствии соразтворителей

Используя подход, описанный в разделе 3.3, были получены константы скорости неферментативного окисления восстановленного флавина и распада связанного с люциферазой 4а-гидропероксифлавина (Интермедиата II) в растворах с этиленгликолем, сорбитолом, глюкозой, декстраном и PEG. Кинетические кривые неферментативного окисления FMNH₂ в средах с этиленгликолем, сорбитолом, глюкозой, декстраном и PEG представлены на рисунке 4.2. В случае PEG первые 0,25 с наблюдалась опалесценция, препятствующая регистрации сигнала.

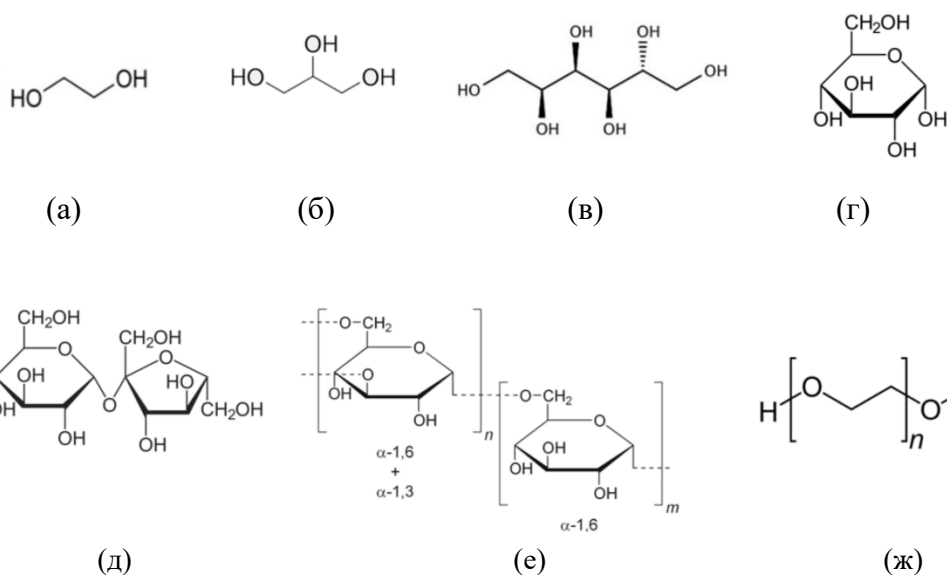


Рисунок 4.1 – Структурные формулы используемых соразворителей: (а) этиленгликоль, (б) глицерин, (в) глюкоза, (г) сорбитол, (д) сахароза, (е) декстран, (ж) полиэтиленгликоль.

Таблица 4.1 – Физико-химические характеристики соразворителей, использованных в работе*

№	Характеристика	Соразворитель						
		Этилен-гликоль	Глицерин	Глюкоза	Сорбитол	Сахароза	Декстран	ПЭГ
1	M_r , Да	62	92	182	180	342	70 000	4 000
2	r_h , Å	2,6	3,1	3,6	3,9	5,2	60	19,7
3	LogP	-1,36	-1,75	-3,3	-2,2	-3,67	—	—
5	Sol_w , г/л	Растворим в любых пропорциях	Растворим в любых пропорциях	820,0 (25 °C)	689,4 (20 °C)	671,0 (25 °C)	15,0 (25 °C)	65,0 (25 °C)
6	pK_a	15,1	13,99-15,40	12,03-13,85	13,57	11,6-12,7	—	—
7	k_N	-2,066	-2,22 -1,65 -1,05 -0,98	-2,25 -2,73 -2,92	-1,16 -1,65 -2,6	-6,47 -6,78 -7,4	—	—

* M_r – молекулярная масса, r_h – эффективный гидродинамический радиус, LogP – показатель коэффициента распределения октанол/вода, Sol_w – растворимость в воде, pK_a – константа диссоциации кислоты, k_N – константа Норриша.

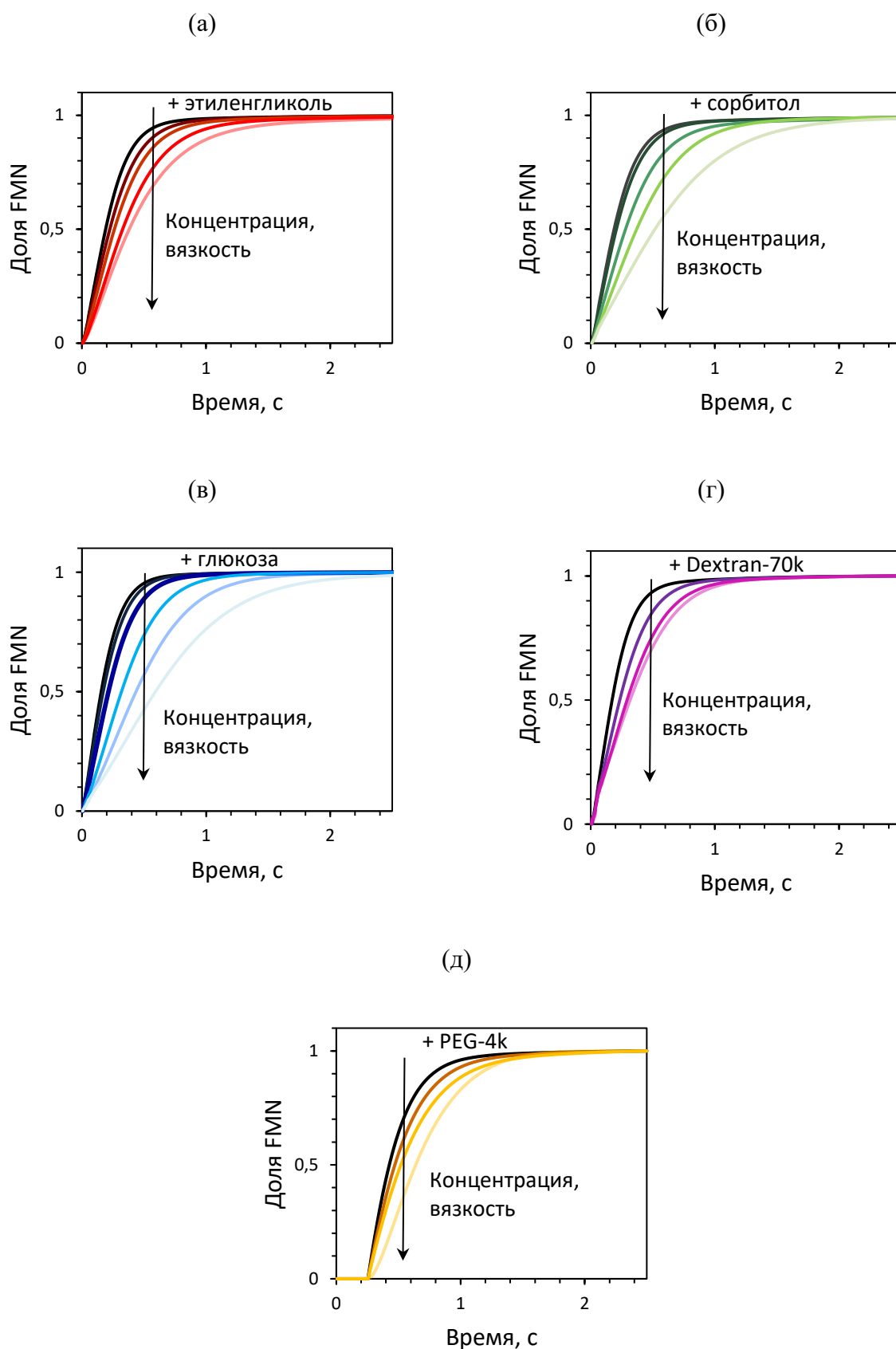


Рисунок 4.2 – Кинетические кривые неферментативного окисления FMNH_2 в средах с соразвителями: (а) 0, 10, 20, 30 и 40 % этиленгликоля, (б) 0, 10, 20, 30 и 40 % сорбитола, (в) 0, 10, 20, 30 и 40 % глюкозы, (г) 0, 5, 10, 15 % Dextran-70к, (д) 0, 5, 10, 15 % PEG-4к.

Аппроксимация экспериментальных кривых экспоненциальной функцией в диапазоне 0–0,5 с позволила получить константы скорости k_d . Зависимость этой константы от вязкости среды представлена на рисунке 4.3, а. Видно, что для всех изученных сорастворителей наблюдается диффузионный контроль скорости данного процесса, так как изменение константы скорости хорошо описывается степенной функцией с показателем $-0,84$.

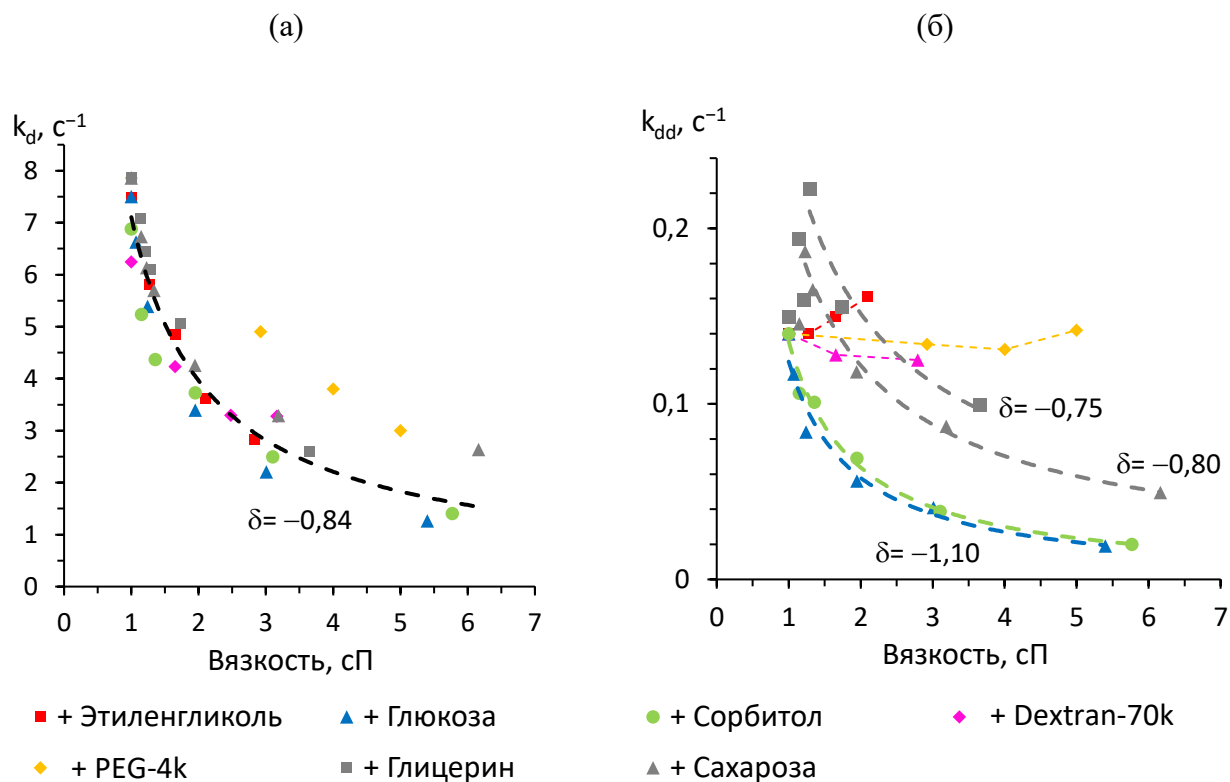


Рисунок 4.3 – Константы скорости неферментативного окисления восстановленного флавина k_d (а) и темнового распада Интермедиата II k_{dd} (б). Штриховые линии отражают аппроксимацию данных степенной функцией с указанным показателем.

При построении зависимостей значения вязкости растворов этиленгликоля, глюкозы и сорбитола были взяты из литературных данных ([116], [117] и [118], соответственно). Вязкость суспензий полимера декстрана была оценена экспериментально с помощью флуоресценции молекулярного ротора 9-(2-карбокси-2-циановинил)юлолидина (CCVJ), по методике, описанной, в частности, в [119]. Для растворов с содержанием декстрана 5, 10 и 15 % были получены значения вязкости 1, 1,65, 2,48 и 3,17 сП соответственно (при 20 °C). Аналогично были получены значения вязкости для растворов с содержанием полиэтиленгликоля 5, 10 и 15 %: 2,92, 4,0 и 5,0 сП соответственно. Важно отметить, что эти значения отражают создаваемую полимером микровязкость, то есть затруднение вращению молекулы

флуоресцентного зонда в области его локализации в суспензии полимера. Известно, что растворы биополимеров относятся к неньютоновским жидкостям, и экспериментальное определение значения вязкости этих растворов представляет собой нетривиальную задачу [9].

Мы получили, что в присутствии глюкозы и сорбитола также наблюдается замедление скорости темнового распада Интермедиата II (Рисунок 4.3, б). Однако в отличие от сред с сахарозой и глицерином, при низких концентрациях данных сорастворителей не наблюдался дестабилизирующий эффект (увеличение k_{dd} при содержании 10%).

Влияние декстрана на k_{dd} оказалось гораздо слабее, чем остальных сорастворителей. При концентрации этого полимера 10% (микровязкость 2,48 сП) константа скорости уменьшилась только на 16% по сравнению со значением в буфере. Причиной такого отличия может быть неоднородность раствора декстрана, приводящая к неоднородному распределению значений локальной вязкости. В такой ситуации специфика локализации молекулы люциферазы (Интермедиата II) может приводить к отсутствию влияния вязкости на k_{dd} .

Было получено, что растворы этиленгликоля не замедляют распад Интермедиата II даже при концентрации сорастворителя 50 % (вязкость 2,1 сП). Напротив, наблюдается увеличение k_{dd} на 15% по сравнению со значением в буфере, то есть стабильность интермедиата уменьшается. Можно предположить несколько механизмов, ответственных за такое действие растворов этиленгликоля. Дестабилизацию Интермедиата II мы наблюдали и для растворов глицерина и сахарозы, но при меньших концентрациях и вязкостях (<1,3 сП), что подробно обсуждается в п. 3.3. Мы предполагаем, что уменьшение k_{dd} в растворах глицерина и сахарозы с вязкостью >1,3 сП связано с затрудненной диффузией продуктов распада (флавина и перекиси водорода) из активного центра фермента. Этот процесс противоборствует с дестабилизацией Интермедиата II сорастворителями путём, вероятно, взаимодействия с мобильной петлёй люциферазы. В такой ситуации возможно, что в растворах этиленгликоля не достигаются такие вязкости, при которых затруднение диффузии может пересилить дестабилизирующее действие на мобильную петлю. Либо этиленгликоль оказывает специфическое (не сходное ни с каким другим сорастворителем) действие на структуру бактериальной люциферазы, увеличивая скорость темнового распада одного из интермедиатов реакции.

4.2 Кинетические эффекты сред с различными молекулярными размерами на биолюминесцентную реакцию, катализируемую бактериальной люциферазой

Кинетику испускания биолюминесценции в результате реакции бактериальной лю-

циферазы ($1\text{ }\mu\text{M}$) с восстановленным фавинмононуклеотидом ($15\text{ }\mu\text{M}$) и деканалем ($10\text{--}50\text{ }\mu\text{M}$) регистрировали так, как это описано в разделе 3.2 с тем отличием, что оба смешиваемых раствора содержали 10-30% этиленгликоля, 10-40% сорбитола или глюкозы, 5-15% декстрана или PEG. Кинетические кривые биолюминесценции при различных концентрациях сорастворителей и зависимость эмпирических кинетических параметров от вязкости среды представлены на рисунках 4.4 и 4.5.

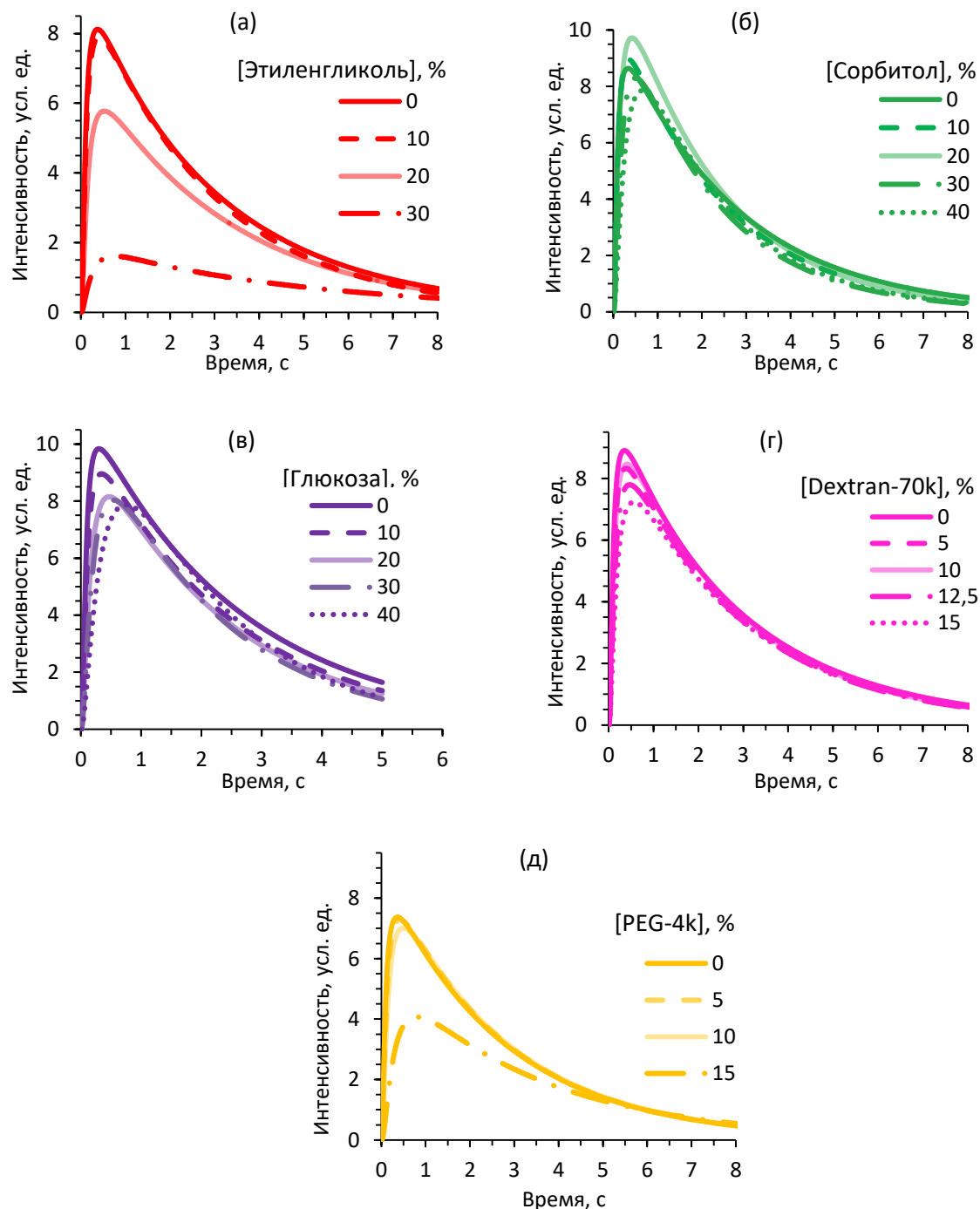


Рисунок 4.4 – Кинетические кривые биолюминесцентной реакции с $50\text{ }\mu\text{M}$ деканала в средах с этиленгликолем (а), сорбитолом (б), глюкозой (в), Dextran-70к (г) и PEG-4к (д).

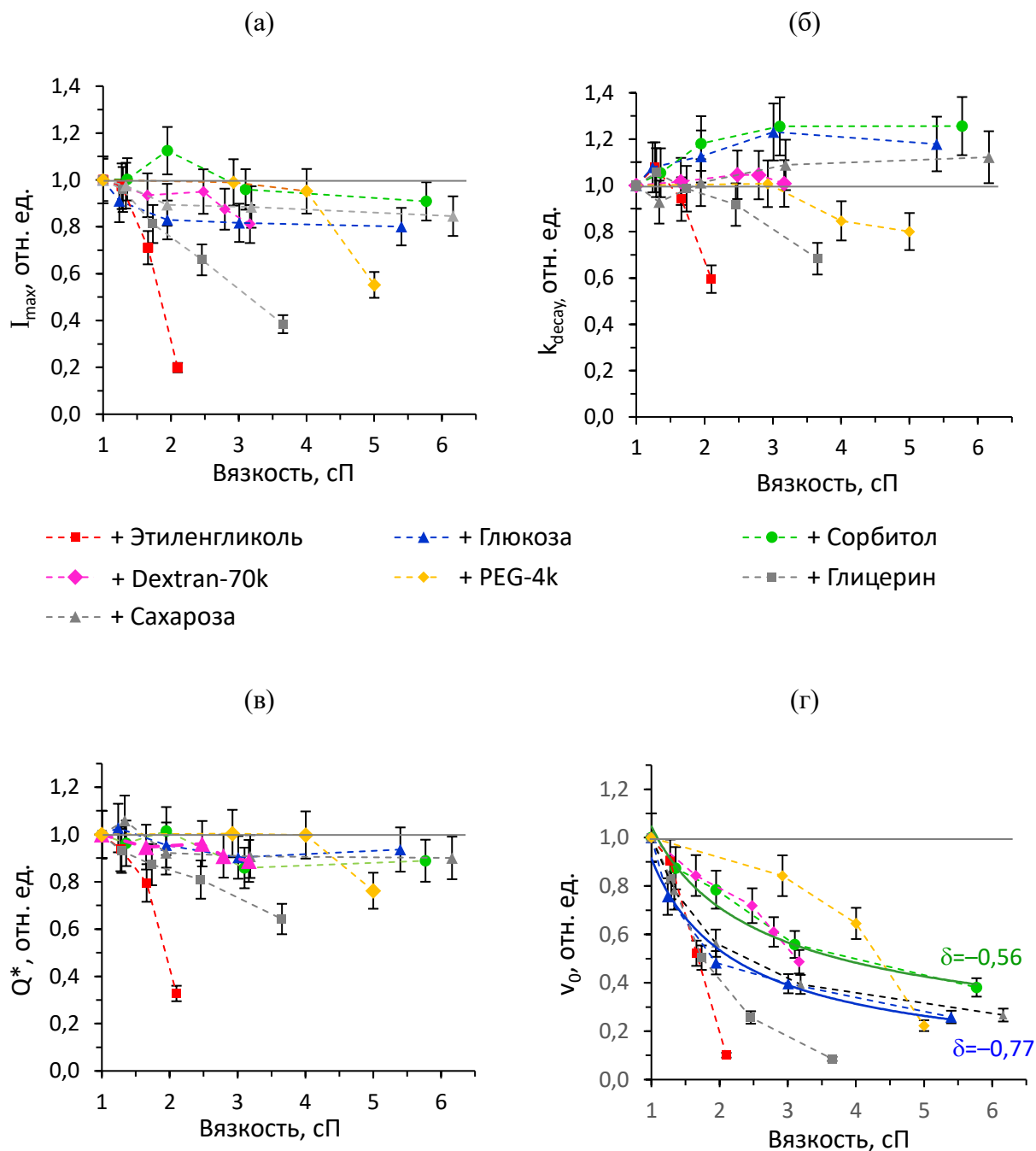


Рисунок 4.5 – Зависимость максимальной интенсивности (а), константы спада (б), интегральной интенсивности (в) и начальной скорости реакции (г) от вязкости среды, для кинетических кривых биолюминесценции в реакции с 50 μM деканала в средах с этиленгликолем (красный), сорбитолом (зелёный), глюкозой (синий), PEG (желтый), и декстраном (розовый). Горизонтальные сплошные линии показывают значение параметра для буфера (вязкость 1 сП). Пунктирные линии приведены для наглядности. Серыми маркерами показаны параметры для сред с глицерином и сахарозой [137].

Можно видеть, что действие сорбитола, глюкозы и декстрана сходно с действием сахарозы. Все они не оказывают существенного влияния на интегральную интенсивность света, излучаемого за один оборот люциферазы, хотя и имеют тенденцию (кроме декстрана) немного увеличивать значение константы спада k_{decay} (Рисунок 4.5, б, в). В присутствии этиленгликоля наблюдается значительное снижение интенсивности излучаемого света и замедляется спад. В целом эти эффекты похожи на влияние растворов глицерина на реакцию, но они гораздо сильнее выражены, если сравнивать одинаковые концентрации соразтворителя или вязкости этих сред. Так, в присутствии 30 % глицерина (вязкость $\approx 2,5$ сП) интегральная интенсивность биолюминесценции снижается на 15% (Рисунок 3.1), а в присутствии 30 % этиленгликоля (вязкость ≈ 2 сП) – на 67 % (Рисунок 4.4, а). Большинство соразтворителей лишь незначительно влияют на максимальную интенсивность I_{max} , только этиленгликоль подобно глицерину вызывает снижение этого параметра. Все изученные вязкие среды замедляют начальную скорость реакции, при этом только для некоторых из них зависимость $v_0(\eta)$ может быть хорошо аппроксимирована степенной функцией, что в этих случаях указывает на диффузионные ограничения скоростью-лимитирующей стадии (Рисунок 4.5, г). Следовательно, влияние исследуемых соразтворителей на элементарные стадии реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, различно, и не полностью определяется повышенной вязкостью.

4.3. Зависимость констант скорости отдельных стадий реакции от вязкости среды

Путем моделирования 5-ти кинетических кривых, полученных при разных концентрациях альдегида (10, 20, 30, 40 и 50 μM), были вычислены константы скорости отдельных стадий реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в средах с различным содержанием этиленгликоля, глюкозы, сорбитола, полиэтиленгликоля и декстрана.

Зависимость константы скорости связывания восстановленного флавиномононуклеотида с люциферазой (k_1) от вязкости сред с этиленгликолем, глюкозой, сорбитолом и декстраном представлены на рисунке 4.6, а. Полученные данные указывают на выраженную роль замедления диффузии в уменьшении скорости этой стадии в исследованных вязких средах: для растворов глюкозы, сорбитола и декстрана показатель δ степенной функции, описывающей зависимость, составляет $-0,97$, что близко к полученному ранее значению для сред с сахарозой. В случае этиленгликоля показатель степени превышает по модулю единицу ($\delta = -1,83$), данное значение близко к полученному ранее для глицерина (Рисунок 3.8, а).

Ни один из соразтворителей не оказал существенного влияния на скорость связывания кислорода и образования Интермедиата II (Рисунок 4.6, б). Это подтверждает невозможность

определения механизмов влияния соразтворителей на скорость данной стадии в рамках выбранной кинетической модели, о чем говорилось в Главе 3.

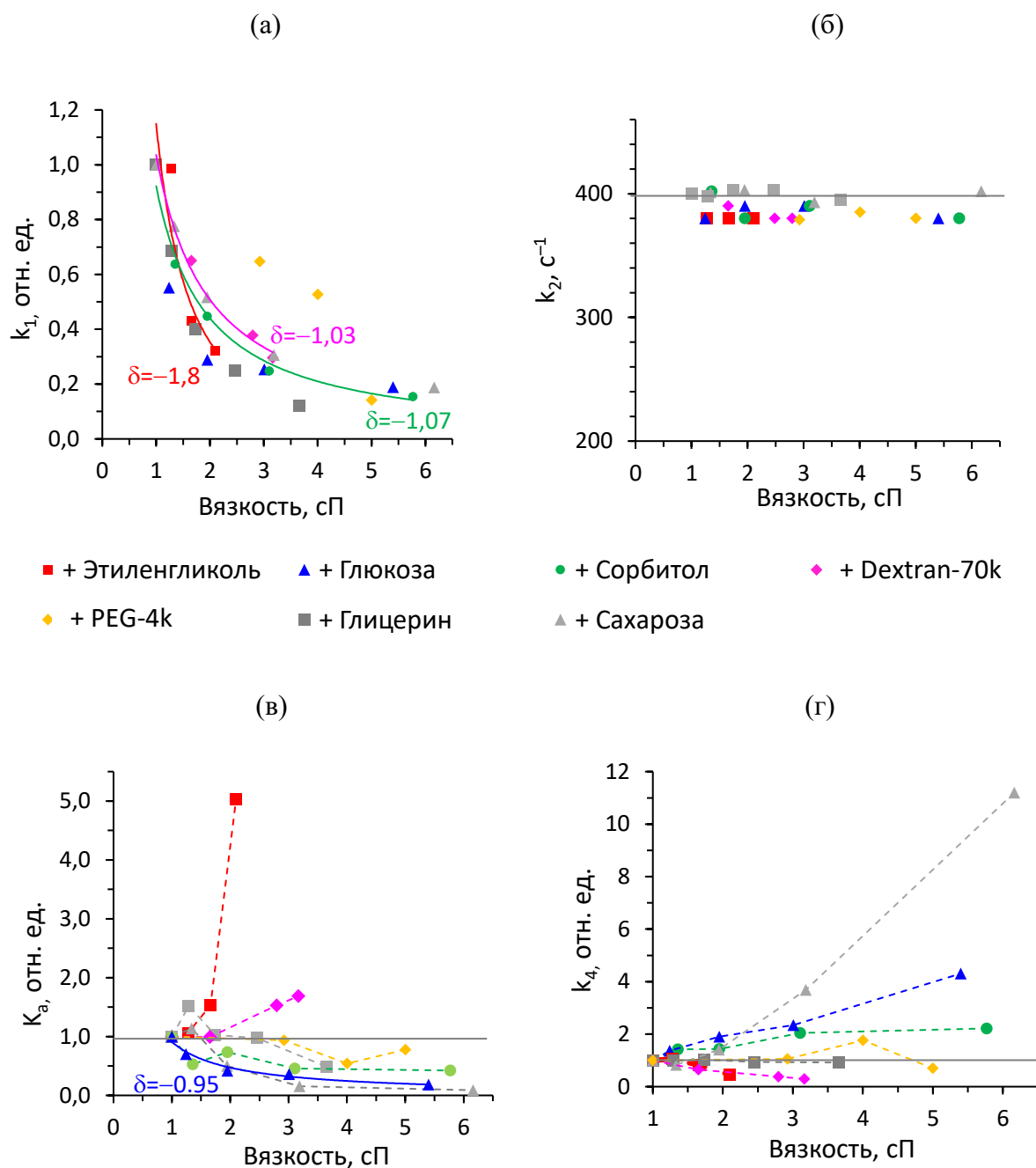


Рисунок 4.6 – Зависимость константы связывания –люциферазы с восстановленным флавинмононуклеотидом, k_1 (а), константы скорости формирования Интермедиата II реакции, k_2 (б) константы ассоциации альдегида K_a ($K_a = k_3/k_{-3}$) (в) и каталитической константы k_4 (г) от вязкости среды в растворах этиленгликоля (красный), сорбитола (зелёный), глюкозы (синий), PEG (желтый) и декстрана (розовый). Серыми маркерами показаны параметры для сред с глицерином и сахарозой, представленные в Главе 3. Цветные сплошные линии представляют аппроксимацию данных степенной функцией. Горизонтальные серые линии показывают значение параметра для буфера (вязкость 1 сП). Пунктирные линии приведены для наглядности [137].

Наиболее выраженное снижение константы ассоциации деканала наблюдалось в растворах глюкозы, сорбита и сахарозы, в то время как в растворах этиленгликоля и декстрана наблюдалась тенденция к усилению связывания альдегида (Рисунок 4.6, в). Также, как в случае глицерина и сахарозы, каталитическая константа k_4 не зависит от вязкости и демонстрирует наибольшую специфику относительно выбранного соразтворителя (Рисунок 4.6, г). Наименьший по размеру этиленгликоль уменьшает скорость данного процесса (приблизительно в два раза при концентрации 30%), в то время как сорбитол и глюкоза оказывают активирующий эффект подобно сахарозе, хотя их молекулы меньше по сравнению с сахарозой. Декстран и полиэтиленгликоль проявили слабый эффект на k_4 , хотя являются самыми массивными среди соразтворителей.

4.4 Связь кинетических параметров с характеристиками молекул соразтворителей

Как было показано в разделах 4.2 и 4.3, константы скоростей таких процессов как распад пероксифлавинового интермедиата (с константой скорости k_{dd}) и связывание флавина (с константой скорости k_1) проявляют степенную зависимость от вязкости среды. Специфика влияния соразтворителей проявляется в значениях δ : среды с соразтворителями меньших молекулярных размеров, такие как этиленгликоль и глицерин, вызывают увеличение этого показателя до $\approx 1,8$ (Рисунок 4.6, а). Это говорит о существовании не диффузионных механизмов, усугубляющих опосредованное вязкостью замедление константы k_1 этими соразтворителями. Наблюдаемый эффект может быть результатом небольших размеров этих молекул, за счет чего они способны проникать в полость активного центра и присутствовать вблизи места связывания флавина.

Было получено, что окисление восстановленного флавина молекулярным кислородом замедляется при увеличении вязкости, независимо от типа используемого соразтворителя. Отклонение δ от единицы для $k_d(\eta)$ можно объяснить тем фактом, что это сложный (многостадийный и автокаталитический) процесс [98], и k_d в данном случае является кажущейся константой скорости. Аналогичное снижение скорости окисления в вязких средах было продемонстрировано для другого важного клеточного метаболита – NADH [138]. Как следствие, авторы предположили, что накопление различных соразтворителей, повышающих вязкость, в бактериальных клетках может быть механизмом сохранения подобных низкомолекулярных метаболитов.

Примечательно, что полученную нами степенную зависимость $k_d(\eta)$ можно использовать для оценки эффективной вязкости растворов. Так, основываясь на наших результатах, представленных на рисунке 4.3, а, можно предположить, что вязкость растворов PEG-4к (5-15 %), определенная с помощью молекулярного ротора CCVJ, была завышена на 1-2 сП. Хорошо из-

вестно, что полимерные молекулы не способны образовывать истинные растворы, и невозможно охарактеризовать их смеси постоянным значением вязкости. Если мы примем поправку на вязкость растворов PEG-4k в соответствии с данными рисунка 4.3, а, то вязкостные зависимости для этого соразтворителя, представленные на рисунке 4.5 и 4.6, станут сходными с зависимостями, полученные для глицерина. В то же время вязкость для второго краудинг-агента – декстрана, также полученная с помощью молекулярного ротора, по-видимому, соответствует «эффективному» значению. Такое несходство свойств биополимеров можно объяснить различием формы их макромолекул, что приводит к неодинаковому влиянию на трансляционную диффузию [139].

Был продемонстрирован диффузионный контроль распада Интермедиата II (константа скорости k_{dd} , Рисунок 4.3, б) для всех низкомолекулярных соразтворителей, кроме этиленгликоля. Константа скорости k_{dd} является константой первого порядка, диффузионное ограничение таких процессов – редкое, но не уникальное событие, в котором лимитирующей стадией является высвобождение продукта [140]. При этом вязкостная зависимость k_{dd} наблюдается только в присутствии низкомолекулярных соразтворителей, но не краудинг-агентов. Это может говорить о том, что для контроля диффузии требуется более высокая вязкость непосредственно вблизи активного центра, где могут присутствовать низкомолекулярные соразтворители, но не могут присутствовать краудинг-агенты большого размера. Стоит отметить, что интермедиаты биохимических реакций, содержащие аддукт 4a-(гидро)пероксифлавин, выполняют многие важные функции как в прокариотических, так и эукариотических клетках [141]. Следовательно, стабилизация таких интермедиатов вязкой средой также может быть одним из биологических механизмов приспособления живых клеток к неблагоприятным условиям.

Таким образом, с одной стороны, повышенная вязкость способствует сохранению одного из субстратов и интермедиата реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, что повышает эффективность биолюминесценции. С другой стороны, ограничение диффузии также снижает скорость связывания субстрата. В сумме это приводит к сохранению примерно постоянного количества испускаемых квантов за один оборот фермента в средах с вязкостью в диапазоне 1-6 сП (Рисунок 4.5, в). В литературе встречаются примеры, когда повышенная вязкость оказывает разнонаправленное воздействие на кинетические параметры, изменения которых компенсируют друг друга, и таким образом создается ложное ощущение отсутствия эффектов [142].

Особым случаем среди соразтворителей оказался этиленгликоль, о чем свидетельствуют кинетические параметры (рисунки 4.4-4.6), а также структурно-динамические характеристики, полученные методами молекулярной динамики [137]. Этиленгликоль продемонстрировал самый высокий уровень предпочтительного взаимодействия с поверхностью люциферазы, что

может быть причиной реориентации боковых цепей аминокислот, увеличения радиуса гирации и площади поверхности белка. То, что кинетические эффекты этиленгликоля связаны с его действием на фермент, а не на субстрат (флавиномононуклеотид), подтверждается тем фактом, что зависимость $k_d(\eta)$, полученная для его смесей с буфером, аналогична зависимостям для других соразтворителей (Рисунок 4.3, а). Однако нельзя исключать взаимодействия этиленгликоля с деканалем, так как наблюдается значительное изменение константы ассоциации этого субстрата (Рисунок 4.6, в). Наши результаты согласуются с ранее опубликованными данными, демонстрирующими, что этиленгликоль предпочтительно накапливается вокруг гидрофобных остатков белков, что отличает его от других соразтворителей-полиолов и приводит к нетипичному воздействию на стабильность белков [143]. Различия в действии этиленгликоля и глицерина на кинетику фермента показаны для глюкоамилазы [147]. Авторы предположили, что в присутствии соразтворителей проявляются два конкурирующих эффекта: во-первых, специфическое взаимодействие соразтворителя с ферментом, облегчающее стадию высвобождения продукта, во-вторых, увеличение вязкости раствора, что может тормозить функционально важные конформационные изменения, замедляя стадию высвобождения продукта. При этом в присутствии глицерина имеет место только второй механизм.

Несмотря на то, что вязкость сред с краудинг-агентами является трудно определяемым параметром и зависит от многих факторов [139], в растворах PEG-4к и Dextran-70к были получены удовлетворительные зависимости некоторых кинетических параметров реакции, соответствующие концепции диффузионных ограничений (рисунки 4.3, а и 4.6, а). Однако специфического эффекта макромолекул на функционирование бактериальной люциферазы, который мог бы быть отнесён к эффекту исключенного объема, не было выявлено. Из литературы известно, что наиболее чувствительны к эффектам макромолекулярного краудинга крупные олигомерные белки [142], хоть и имеются примеры изменения каталитической константы ферментов, сравнимых по размеру с бактериальной люциферазой, в присутствии краудинг-агентов [12].

Один из ключевых вопросов, данного исследования, заключается в том, какое свойство микроокружения определяет каталитическую константу (k_4) бактериальной люциферазы. По рисунку 4.6, г видно, что если исключить влияние диффузионно-контролируемых стадий, то эффективность катализа будет зависеть не от вязкости среды, а от типа соразтворителя. Анализ различных свойств использованных вязких растворов позволил предположить, что характер взаимодействия вода–соразтворитель может модулировать каталитическую константу люциферазы. А именно, была обнаружена корреляцию между k_4 и константами Норриша соразтворителей (Рисунок 4.7).

Константа Норриша k_N характеризует способность вещества изменять активность воды a_w после растворения. Если k_N вещества >0 , то активность воды в его растворе больше, чем мольная доля воды, и наоборот (более подробно об этом рассказано в разделе 1.2.3).

Смысл наблюдаемой корреляции для k_4 заключается в том, что каталитическая способность люциферазы определяется не активностью воды как таковой (на рисунке 4.7 приведены данные для одинаковых условий $a_w=0,98$), а свойством соразтворителя изменять эту активность. Грубо обобщая, можно сказать, что чем меньше молекул соразтворителя требуется добавить в раствор, чтобы снизить активность воды до определенного уровня, тем выше будет скорость катализа люциферазы в среде с этим соразтворителем.

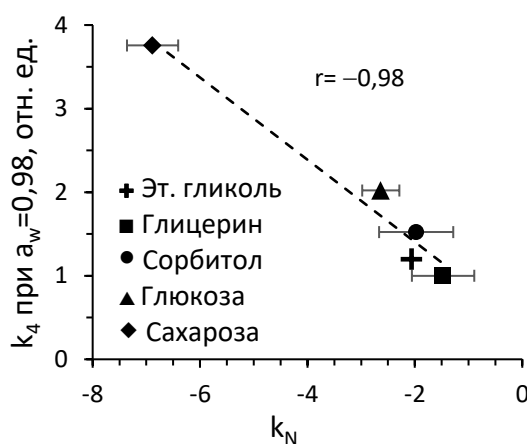


Рисунок 4.7 – График корреляции между каталитической константой k_4 бактериальной люциферазы в растворах с $a_w \approx 0,98$ (этиленгликоль 10%, глицерин 10%, сорбитол 20%, глюкоза 20%, сахароза 30%) и константой Норриша k_N соразтворителей. k_N рассчитывали как (среднее $\pm$ стандартное отклонение) на основе литературных данных [11]. Указан коэффициент линейной корреляции r . Пунктирная линия представляет линейную аппроксимацию данных [137].

Вообще, в публикациях превалирует три основных направления интерпретации понятия «активность воды» [11]. Активность воды считают мерой:

- 1) количества свободной (несвязанной) воды;
- 2) «структурированности» воды и растворенных веществ;
- 3) количества «гидратной воды», которая исходит из стехиометрических моделей кластеризации/связывания воды и растворенных веществ.

Вывод на основе первичных термодинамических принципов показал, что значение константы Норриша вещества определяется энергиями взаимодействий в парах вода-соразтворитель, вода-вода и соразтворитель-соразтворитель. Причем последнее взаимодействие вносит значительный вклад в величину k_N [11].

Связь скорости ферментативной реакции с активностью воды чаще всего интерпретируют через ослабление/усиление гидрофобных взаимодействий с субстратом вследствие изменения a_w [145]. Хотя известно, что скорости химических процессов могут существенно зависеть от активности воды, такой подход редко применяется для интерпретации эффекта на ферментативные реакции.

В работе [137] было проведено моделирование молекулярной динамики бактериальной люциферазы в присутствии использованных нами соразтворителей и рассчитаны энергии Кулоновского и Ван-дер-Ваальсовского взаимодействий для всех возможных пар между белком, водой и соразтворителем. Среди полученных энергий наилучшую корреляцию с k_4 проявили энергии Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий пар соразтворитель–вода и соразтворитель–соразтворитель (Рисунок 4.8). Данные результаты косвенно согласуются с корреляцией, полученной для констант Норриша, взятых из литературных данных (Рисунок 4.7).

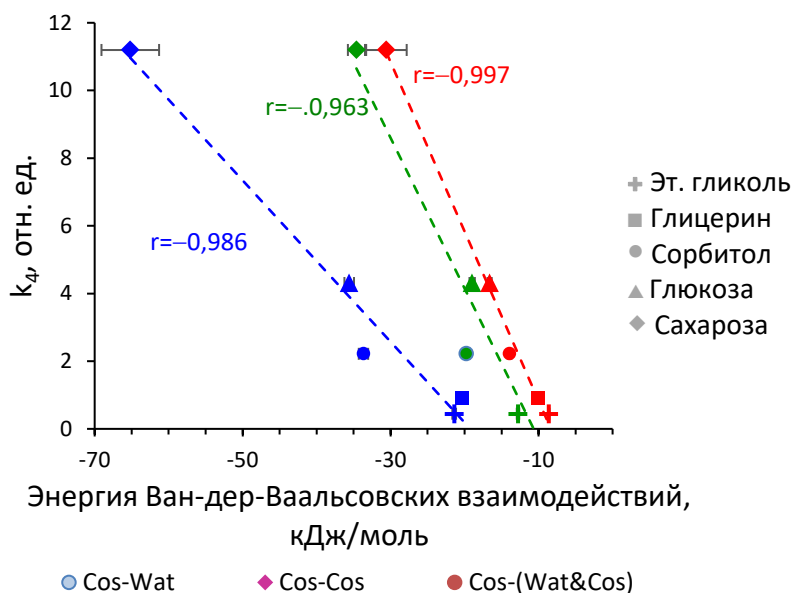


Рисунок 4.8 – График корреляции между k_4 бактериальной люциферазы в растворах с максимальным содержанием соразтворителя (этиленгликоль 30%, глицерин 40%, сорбитол 40%, глюкоза 40%, сахароза 40%) и энергией Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий соразтворителя с водой (Cos-Wat, зеленые маркеры) и с самим собой (Cos-Cos, красные маркеры), а также суммы этих энергий (Cos-(Wat&Cos), синие маркеры). Энергии рассчитаны на одну молекулу соразтворителя как (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) трех независимых вычислений. Указаны коэффициенты линейной корреляции r . Пунктирные линии представляют собой линейные аппроксимации данных. Маркеры соответствуют соразтворителям: этиленгликоль – крест, глицерин – квадрат, сорбитол – круг, глюкоза – треугольник, сахароза – ромб [137].

4.5 Заключение к главе

Было изучено влияние вязких сред с соразтворителями различных молекулярных размеров на элементарные стадии биолюминесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой. После расширения набора соразтворителей, повышающих вязкость, до семи веществ с различными молекулярными массами и размерами можно с уверенностью заключить, что некоторые стадии реакции, такие как распад пероксифлавинового интермедиата и связывание флавина демонстрируют степенную зависимость от вязкости среды с показателем ~ 1 , а, следовательно, контролируются диффузией. Показано, что каталитическая константа фермента не зависит от вязкости, что указывает на то, что во время каталитического акта не происходит масштабных движений доменов люциферазы. Впервые получена корреляция скорости катализа люциферазы с параметрами, описывающими взаимодействия между молекулами воды и соразтворителя (постоянная Норриша).

Результаты указывают на то, что для поддержания стабильного уровня светоизлучения при вариации условий окружающей среды, светящиеся бактерии могли выработать своего рода компенсацию замедления кинетики биолюминесцентной реакции за счет более эффективного катализа в активном центре фермента.

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

5.1 Активность люцифераз *V. harveyi* и *P. leiognathi* при различных температурах в условиях повышенной вязкости

Изменение кинетики реакции при протекании при разных температурах

Как отмечалось ранее (раздел 1.3.2), вязкоадаптация является эффективным механизмом поддержания функционирования и стабильности клеток в стрессовых условиях, таких как, например, изменение температуры [6]. Кинетику биolumинесценции в реакции, катализируемой люциферазой *V. harveyi* и *P. leiognathi*, изучали в буфере и 30% сахарозе в диапазоне температур 5-45 °C. Пример кинетических кривых представлен на рисунке 5.1. По кинетическим кривым были рассчитаны эмпирические параметры: максимальная интенсивность $I_{\max}$, интегральная интенсивность Q^* , константа спада свечения k_{decay} и начальная скорость реакции v_0 . Зависимость некоторых из них от температуры показана на рисунке 5.2.

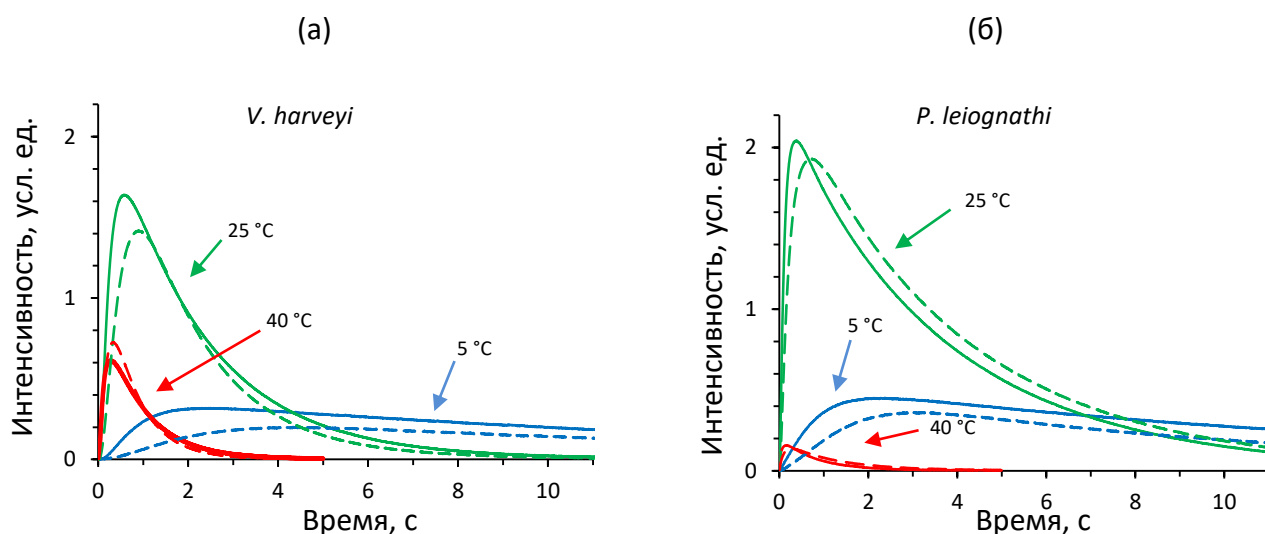


Рисунок 5.1 – Кинетические кривые биolumинесценции в реакции, катализируемой люциферазой *V. harveyi* (а) и *P. leiognathi* (б) при 5 °C (синие линии), 25 °C (зеленые линии) и 40 °C (красные линии), в буфере (сплошные линии) и в растворе 30%-ной сахарозы (штриховые линии). Реакционная смесь содержала 0,5 μM люциферазы, 15 μM флавина и 50 μM деканала.

Получено, что, судя по $I_{\max}$, в буфере люцифераза *V. harveyi* проявляет высокую активность в более широком диапазоне температур, чем фермент *P. leiognathi* (20-35 °C vs 20-25 °C) (Рисунок 5.2, а, б).

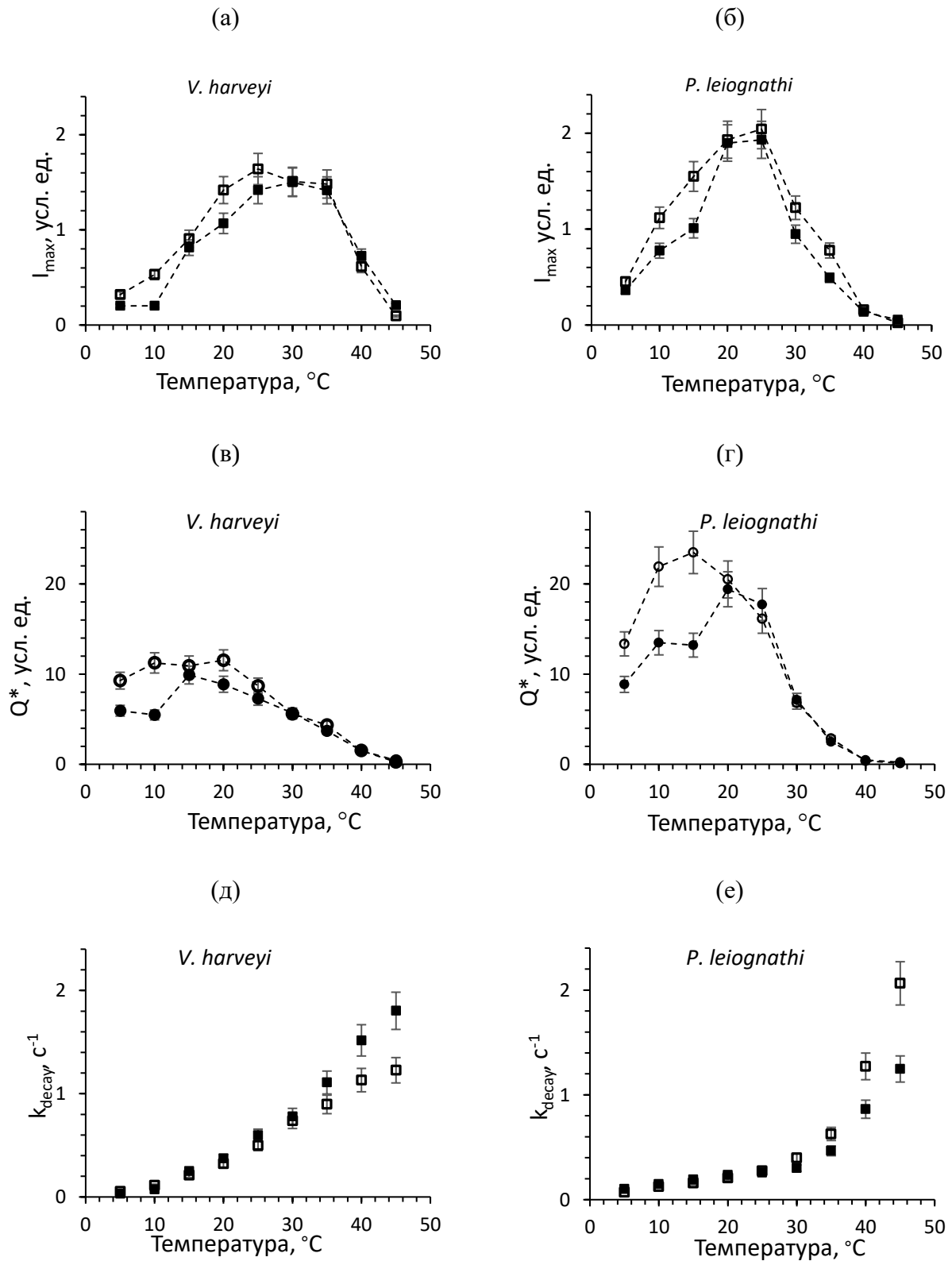


Рисунок 5.2 – Зависимость кинетических параметров люцифераз *V. harveyi* (а, в, д) и *P. leiognathi* (б, г, е) от температуры в буфере (пустые маркеры) и растворе сахарозы (заполненные маркеры): максимальная интенсивность $I_{\max}$ (а, б), интегральная интенсивность Q^* (в, г) и константа спада свечения k_{decay} (д, е). Пунктирные линии приведены для наглядности. Реакционная смесь содержала 0,5 μM люциферазы, 15 μM флавина и 50 μM деканала.

Однако интегральная интенсивность за один оборот фермента в диапазоне 10-25 °C для фермента *V. harveyi* примерно в два раза меньше, чем для фермента *P. leiognathi*, а при более высоких температурах становится почти одинаковой для обеих люцифераз (Рисунок 5.2 в, г). k_{decay} возрастает при росте температуры ≥ 35 °C более резко для люциферазы *P. leiognathi* (Рисунок 5.2 д, е). Таким образом, несмотря на высокую гомологию с ферментом *V. harveyi*, люцифераза *P. leiognathi* проявляет свойства более термолабильного фермента.

Для выявления эффектов, оказываемых экстремолитами на биолюминесцентную реакцию двух видов бактерий, мы изучили кинетику в растворе 30%-ной сахарозы (Рисунок 5.1-5.2). Данная концентрация соответствует 0,99 М сахарозы и дает увеличение вязкости среды в более чем три раза по сравнению с буфером. По кинетическим кривым видно, что реакция замедляется в более вязкой среде для обеих люцифераз (Рисунок 5.1), что связано с диффузионным контролем некоторых стадий реакции, описанным в предыдущих главах. Анализ кинетических параметров показал, что в присутствии сахарозы максимальная интенсивность снижается при низких температурах (для люциферазы *V. harveyi* – в диапазоне 5-20 °C, для люциферазы *P. leiognathi* – в диапазоне 5-15 °C) (Рисунок 5.2, а и б), тогда как влияние на константу спада проявляется только при высоких температурах (Рисунок 5.2, д и е). Все это приводит к снижению интегральной интенсивности реакции в растворе сахарозы при более низких температурах для обеих люцифераз (Рисунок 5.2, в и г). Интересно, что при температуре >30 °C в присутствии сахарозы константа спада свечения k_{decay} выше для люциферазы *V. harveyi* и ниже для *P. leiognathi* по сравнению с буфером.

Наблюдаемое влияние температуры на активность ферментов указывает на следующее: (i) люцифераза *P. leiognathi* более чувствительна к изменению температуры, чем фермент *V. harveyi*, и (ii) присутствие сахарозы (30%) не дает существенных преимуществ для функционирования бактериальных люцифераз при повышенных (35-45 °C) или пониженных (5-15 °C) температурах.

Анализ температурных эффектов на эмпирические кинетические параметры реакции

Для кинетики бактериальной люциферазы *P. leiognathi* был проведён анализ корреляции эмпирических параметров при разных концентрациях соразтворителей (Рисунок 4.5) с вычисленными константами скорости отдельных стадий реакции (Рисунок 4.3 и 4.6). Было получено, что наиболее сильная корреляция наблюдается между начальной скоростью v_0 и константой связывания флавина k_1 (Рисунок 5.3, а). Это может означать, что на начальной стадии (нарастания биолюминесценции) скорость реакции лимитируется скоростью образованием Интермедиата I.

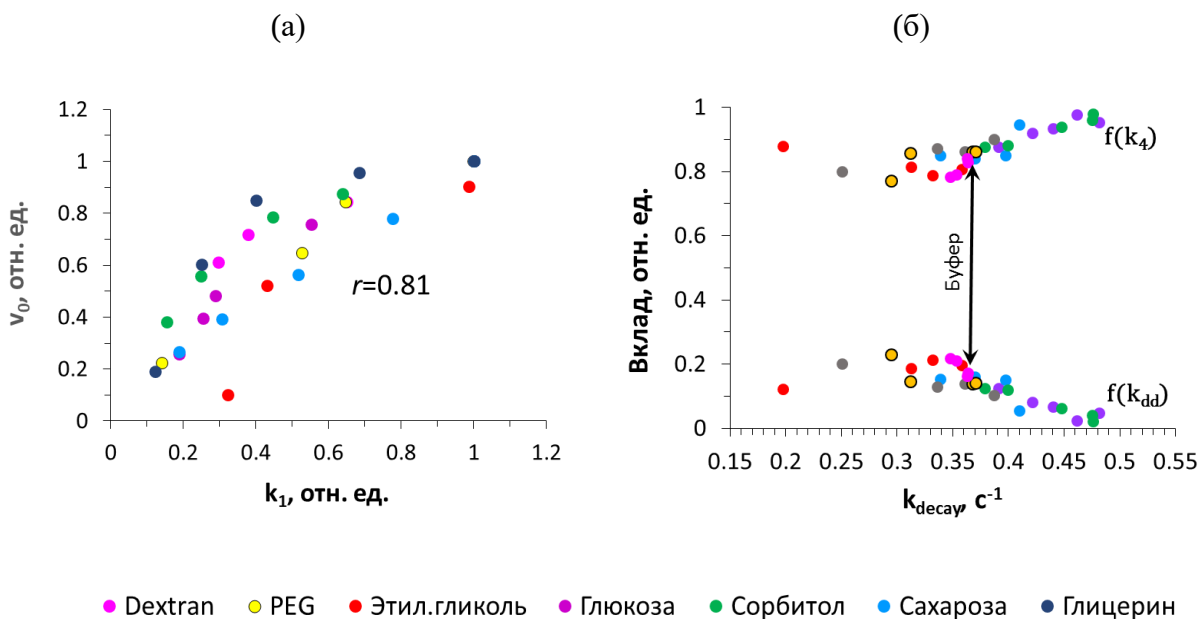


Рисунок 5.3 – Связь эмпирических характеристик кинетики бактериальной люциферазы *P. leiognathi* при разных концентрациях соразтворителей с вычисленными константами скорости отдельных стадий реакции (концентрация альдегида 50 μM): (а) корреляция между начальной скоростью реакции v_0 и константой скорости образования Интермедиата I k_1 ; указан коэффициент корреляции r ; (б) вклады слагаемых $f(k_{dd})$ и $f(k_4)$ в значения k_{decay} .

Для анализа вклада скоростей отдельных стадий реакции в наблюдаемую константу спада свечения k_{decay} , был проведен расчет компонент, входящих в эту константу, согласно уравнению:

$$k_{decay} = \frac{k_{dd} + k_4 \cdot K_a \cdot A}{1 + K_a \cdot A} = \frac{k_{dd}}{1 + K_a \cdot A} + \frac{k_4 \cdot K_a \cdot A}{1 + K_a \cdot A} = f(k_{dd}) + f(k_4), \quad (30)$$

где k_{dd} , k_4 – константы скорости отдельных стадий, согласно рисунку 3.2, $K_a = k_3/k_{-3}$, A – концентрация альдегида.

Подстановка найденных констант скоростей для вязких сред позволила рассчитать вклады компонент k_{decay} , связанных с k_{dd} и k_4 – $f(k_{dd})$ и $f(k_4)$ соответственно. Было получено, что в большинстве случаев вклад $f(k_4)$ составляет $>80\%$ (Рисунок 5.3, б), что позволяет интерпретировать изменения k_{decay} как изменения каталитической константы люциферазы k_4 .

Изменения v_0 и k_{decay} при различных температурах реакционной смеси были проанализированы в соответствии с уравнением Аррениуса (Рисунок 5.4). Вычисленные энергии активации E_a показали, что вязкая среда не меняет E_a начальной стадии реакции (Рисунок 5.4, а), которая может характеризовать связывание люциферазой $FMNH_2$. В то же время, в условиях повышенной вязкости происходит уменьшение E_a , оцененной по константе спада, что может характеризовать каталитическую константу k_4 . В целом, это может говорить о том, что при повы-

шении или понижении температуры относительно нормальных условий 20-25 °С присутствие сахарозы не создает благоприятных условий для связывания восстановленного флавина, но уменьшает потенциальный барьер для катализа, вероятно способствуя сохранению каталитически активной конформации люциферазы.

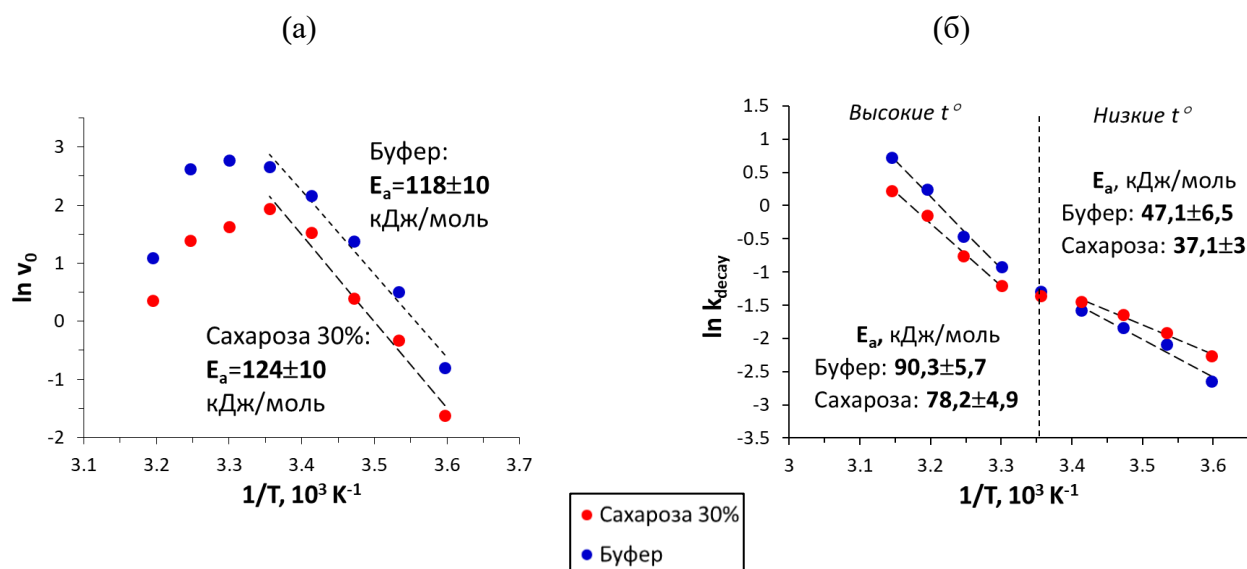


Рисунок 5.4 – Зависимость эмпирических кинетических параметров реакции, катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, от температуры в буфере и сахарозе (в координатах Аррениуса): (а) v_0 ($\sim k_1$); (б) k_{decay} ($\sim k_4$). Указаны энергии активации, вычисленные по линейным участкам. Штриховые линии представляют линейные аппроксимации.

Термоинактивация люцифераз *V. harveyi* и *P. leiognathi*

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. Кинетика термоинактивации ферментов представлена на рисунке 5.5. Следует отметить, что для обоих ферментов мы наблюдали индукционную фазу (от 0,5 до 8 мин, в зависимости от температуры), во время которой остаточная активность оставалась около 100%, что вероятно указывает на восстановление активности после немедленного охлаждения инкубированных ферментов. Более длительная термообработка приводила к последовательному снижению остаточной активности. Мы использовали аппроксимацию экспоненциальной функцией для оценки констант скорости термоинактивации бактериальных люцифераз (Таблица 5.1). В ряде случаев для обоих ферментов наблюдалась дополнительная фаза инактивации при длительном нагревании, а именно при 50 °С (Рисунок 5.5, а, б). Такой эффект обычно объясняют агрегацией белковых молекул, препятствующей их реактивации [38]. Эти данные не были включены в оценку скорости инактивации, также, как и точки фазы индукции.

Сравнивая влияние температуры на две люциферазы, мы обнаружили, что люцифераза *V. harveyi* менее чувствительна к нагреванию: ее остаточная активность всегда выше, чем фермента *P. leiognathi* при тех же условиях. Было показано, что присутствие 30%-ной сахарозы снижает скорость термоинактивации обеих люцифераз (таблица 5.1 и Рисунок 5.5, в и г). Эффект был наиболее выражен для люциферазы *P. leiognathi* при 50 °С – инактивация фермента замедлялась более чем в 4 раза.

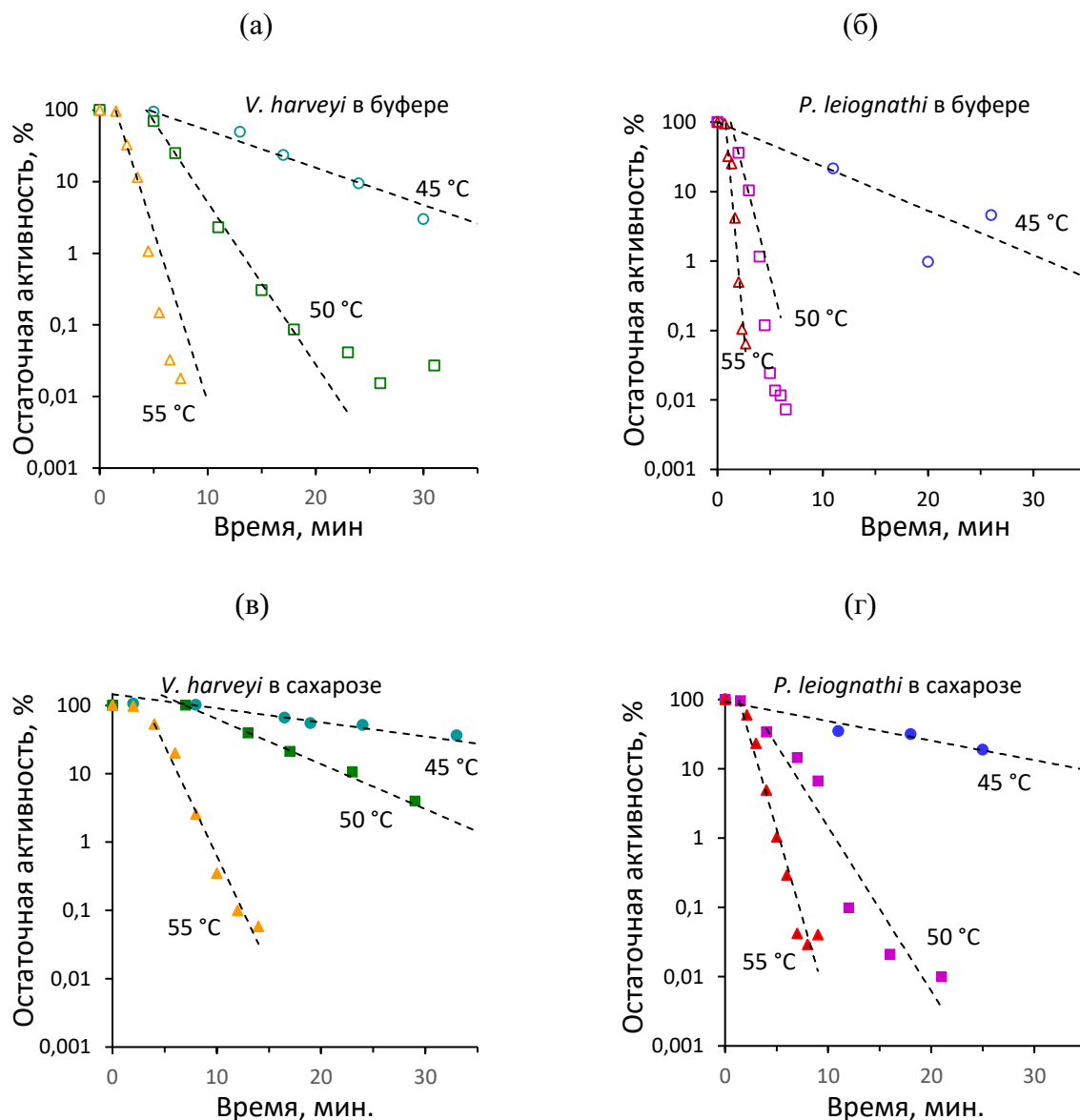


Рисунок 5.5 – Зависимость остаточной активности люцифераз *V. harveyi* (а, в) и *P. leiognathi* (б, г) в буфере (а, б, пустые маркеры) и растворе сахарозы (в, г, заполненные маркеры) от времени инкубации при 45, 50 и 55 °С, в полулогарифмических координатах. Линии являются аппроксимацией экспоненциальной функцией. Концентрации в реакционной смеси: 0,5 μM люциферазы, 15 μM FMNH₂, 50 μM деканала. Активность измеряли при 20°С.

Была построена зависимость констант скорости термоинактивации двух люцифераз в буфере и растворе сахарозы от температуры в координатах Аррениуса (Рисунок 5.5). Несмотря на защитное действие сахарозы, приводящее к снижению констант скорости инактивации (таблица 5.1), не было получено достоверного различия энергий активации термоинактивации E_a в буфере и в вязком растворе (Рисунок 5.6). В частности, 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 также не позволяют выявить различия термостабильности двух люцифераз.

Таблица 5.1 – Константы скорости термоинактивации люцифераз *P. leiognathi* и *V. harveyi* при разных температурах, в буфере и в среде с сахарозой (30%)

<i>P. leiognathi</i>			<i>V. harveyi</i>		
T, °C	$k_{in}, \text{мин}^{-1}$		T, °C	$k_{in}, \text{мин}^{-1}$	
	Буфер	Сахароза 30 %		Буфер	Сахароза 30 %
45	$0,15 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$	40	$0,02 \pm 0,001$	$0,01 \pm 0,001$
48	$0,71 \pm 0,11$	$0,17 \pm 0,01$			
50	$1,36 \pm 0,10$	$0,39 \pm 0,02$	45	$0,12 \pm 0,003$	$0,05 \pm 0,01$
52	$1,63 \pm 0,24$	$0,80 \pm 0,06$	50	$0,52 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,003$
55	$2,69 \pm 0,32$	$1,14 \pm 0,05$	55	$1,10 \pm 0,03$	$0,56 \pm 0,05$

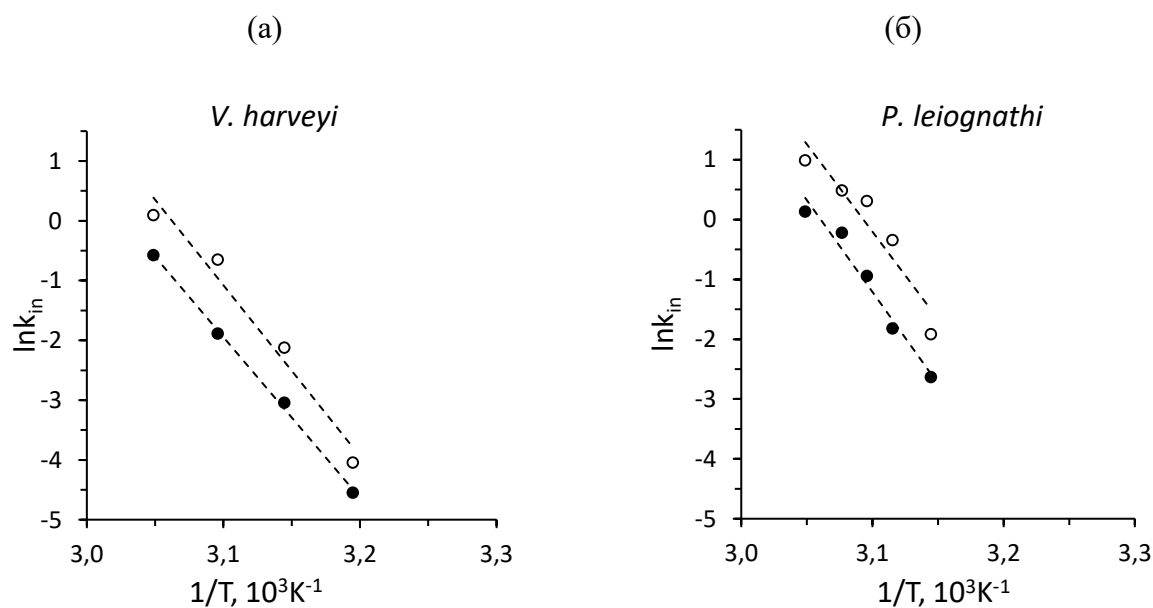


Рисунок 5.6 – Зависимость констант скорости термоинактивации люцифераз *V. harveyi* (а) и *P. leiognathi* (б) от температуры, в буфере (пустые маркеры) и растворе сахарозы (закрашенные маркеры), в координатах Аррениуса. Пунктирные линии отражают линейную аппроксимацию.

Сравнение свойств двух типов люцифераз

Таким образом, мы экспериментально сравнили влияние температуры на две бактериальные люциферазы по двум направлениям: (i) функционирование ферментов при различных температурах, (ii) скорости термической инактивации ферментов. Нашей целью было выявить признаки адаптации белков к изменению температуры для любого из двух ферментов и связать их со структурными свойствами белков. Однако, поскольку термоадаптация светящихся бактерий могла происходить за счет других механизмов, таких как, например, накопление экстремолитов, мы проверили влияние сахарозы на температурные зависимости (как функциональные, так и структурные) бактериальных люцифераз.

Изучение кинетики реакции при 5–45 °C 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 [146].

Активность люциферазы *P. leiognathi* при 10–15 °C хоть и не достигает максимальных значений, но значительно превосходит *V. harveyi*. Данный эффект был объяснен на основе результатов моделирования молекулярной динамики: оказалось, что при низких температурах два подвижных элемента каталитической α -субъединицы проявляют различную мобильность у двух люцифераз [147]. По-видимому, наблюдаемое изменение структурной подвижности не обеспечивает необходимой динамики активного центра фермента *V. harveyi* для эффективного катализа при низких температурах. Стоит отметить, что большинство известных психрофильных штаммов светящихся бактерий действительно относятся к родам *Photobacterium* и *Aliivibrio*, люциферазы которых являются «быстрыми» [148].

Неожиданным результатом оказалось, что константа спада светоизлучения k_{decay} более чувствительна к изменению температуры для реакции люциферазы *V. harveyi*, чем *P. leiognathi* (Рисунок 5.2, в, г). В интервале 10–30 °C k_{decay} первого фермента увеличивается в 4,4 раза, второго – в 3,2 раза. Известно, что константа спада зависит от скоростей трех элементарных стадий реакции: темнового распада интермедиата пероксифлавина (k_{dd}), связывания альдегида и образования электронно-возбужденного интермедиата [108] (уравнение (30)).

Анализ температурных зависимостей активности ферментов в присутствии сахарозы показал, что этот сорастворитель не дает преимуществ для функционирования бактериальных люцифераз ни при высоких (35–45 °C), ни при низких (5–15 °C) температурах. Кроме того, при

низких температурах сахароза снижает активность люцифераз, вероятно, из-за высокой вязкости, которая приводит к усилению диффузионного ограничения реакции.

Наряду с активностью, структурная стабильность белков также играет важную роль в поддержании их функции в экстремальных условиях. Сахариды, как известно, являются одними из лучших протекторов белков от денатурации [149]. Наше исследование кинетики термоинактивации люцифераз *V. harveyi* и *P. leiognathi* в буфере и в присутствии сахарозы показало, что в одних и тех же условиях скорость термоинактивации люциферазы *V. harveyi* всегда меньше, чем фермента *P. leiognathi* (Таблица 5.1). Сахароза замедляет термоинактивацию ферментов в 2-4 раза, при этом не снижая существенно энергию активации процесса.

Стоит отметить, что проведенное ранее исследование разворачивания люцифераз *V. harveyi* и *P. leiognathi* мочевиной выявило, что последний фермент имеет более стабильную третичную и вторичную структуру [114]. Химическое разворачивание бактериальной люциферазы можно считать гораздо более изученным, чем термическую денатурацию. В ряде исследований доказана четырехстадийная схема денатурации люциферазы *V. harveyi* мочевиной [150, 151], где за разворачиванием С-концевого домена α -субъединицы следует диссоциация двух субъединиц и последующая их денатурация. В работе [114] показали, что люцифераза *P. leiognathi* в растворах мочевины разворачивается по тому же пути. Однако результаты, представленные в данной работе, позволяют предположить, что механизм термической денатурации двух исследованных ферментов может различаться. В этом нет ничего удивительного, так как химические и термические процессы денатурации могут не коррелировать ввиду того, что в то время как денатурант взаимодействует с белком специфически, температура влияет на внутримолекулярные контакты не избирательно [152].

Отсутствие знаний о стабильности и активности бактериальной люциферазы при различных температурах является одной из проблем, затрудняющих ее применение в качестве репортера для оперативного мониторинга различных процессов в микробных или эукариотических клетках [153-155]. Предыдущие исследования показали, что для получения воспроизводимого люминесцентного ответа и корректной его интерпретации необходим детальный анализ характеристик самих репортёрных белков, а также влияния среды на их структуру и функцию [154, 156]. Таким образом, полученные в нашей работе данные имеют важное значение для развития молекулярных репортерных систем с использованием двух типов люцифераз с различной (с точки зрения, как активности, так и стабильности) чувствительностью к температуре.

5.2 Изучение механизмов влияния различных факторов на ферментативные биотестовые системы

Влияние токсикантов на кинетику бактериальной люциферазы

Найденные связи между изменениями эмпирических параметров и констант скоростей отдельных стадий биолюминесцентной реакции бактерий (Рисунок 5.3) могут быть использованы для выяснения механизмов воздействия различных химических соединений (поллютантов, ксенобиотиков) на ферментативные тестовые системы, включающие бактериальную люциферазу. Биферментная тестовая система, в которой восстановленный флаavin для люциферазы производится вторым ферментом – NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой, активно используется для выявления токсикантов в природных средах (воде, почве, воздухе) [157-159] и анализа изменений биологических жидкостей (крови, слюны) [160, 161]. При этом, среди физико-химических механизмов воздействия ксенобиотиков на такую тест-систему называется влияние на каталитическую константу бактериальной люциферазы через изменение структуры фермента или вмешательство в процессы переноса протона/электрона, сопровождающие каталитический акт [162].

Известно, что перенос электрона (или заряда) является необходимой стадией всех химических и биохимических процессов, в том числе и биолюминесцентных. Поэтому предполагается, что ксенобиотики, способные воздействовать на перенос электрона (заряда), изменяют интенсивность биолюминесцентного сигнала в ферментативных системах. Заряженные соединения (катионы, анионы), диполи, радикалы – наиболее активные ингибиторы/активаторы переноса электрона. Эффективность воздействия солей металлов на биферментную биолюминесцентную систему была рассмотрена с точки зрения электронно-акцепторных (донорных) свойств катионов и анионов. При исследовании ингибирования солями с анионами Cl^- , NO_3^- и SO_4^{2-} было установлено, что ингибирующая способность зависит только от природы катиона [163].

В нашей работе было показано, что степень ингибирования ионами меди моноферментной реакции, катализируемой NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой, и биферментной системы люцифераза+NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза различна [164]. Значение IC_{20} (концентрации, при которой ферментативная активность снижалась на 20%) для этих тест-систем составило 2,98 и 0,45 μM соответственно. Для того, чтобы определить вклад люциферазы в наблюдаемое ингибирование биферментной системы, была изучена нестационарная кинетика биолюминесцентной реакции в присутствии сульфата меди (II). Были проведены эксперименты с двумя типами смешивания: соль добавляли либо в раствор субстратов (Рисунок 5.5, а), либо в раствор люциферазы

зы (Рисунок 5.5, б). Полученные кинетические кривые сравнивали с контролем, измеренным в отсутствие сульфата меди.

Было получено, что добавление высоких ($>600 \mu\text{M}$) концентраций сульфата меди в раствор субстратов не вызывает ингибирование реакции (Рисунок 5.5, а). Судя по всему, ингибирующая способность ионов меди нейтрализуется присутствующим в растворе субстратов EDTA [165]. Однако, добавление низких ($<1 \mu\text{M}$) концентраций сульфата меди в раствор фермента приводит к значительному ингибированию биолюминесцентной реакции (Рисунок 5.5. б).

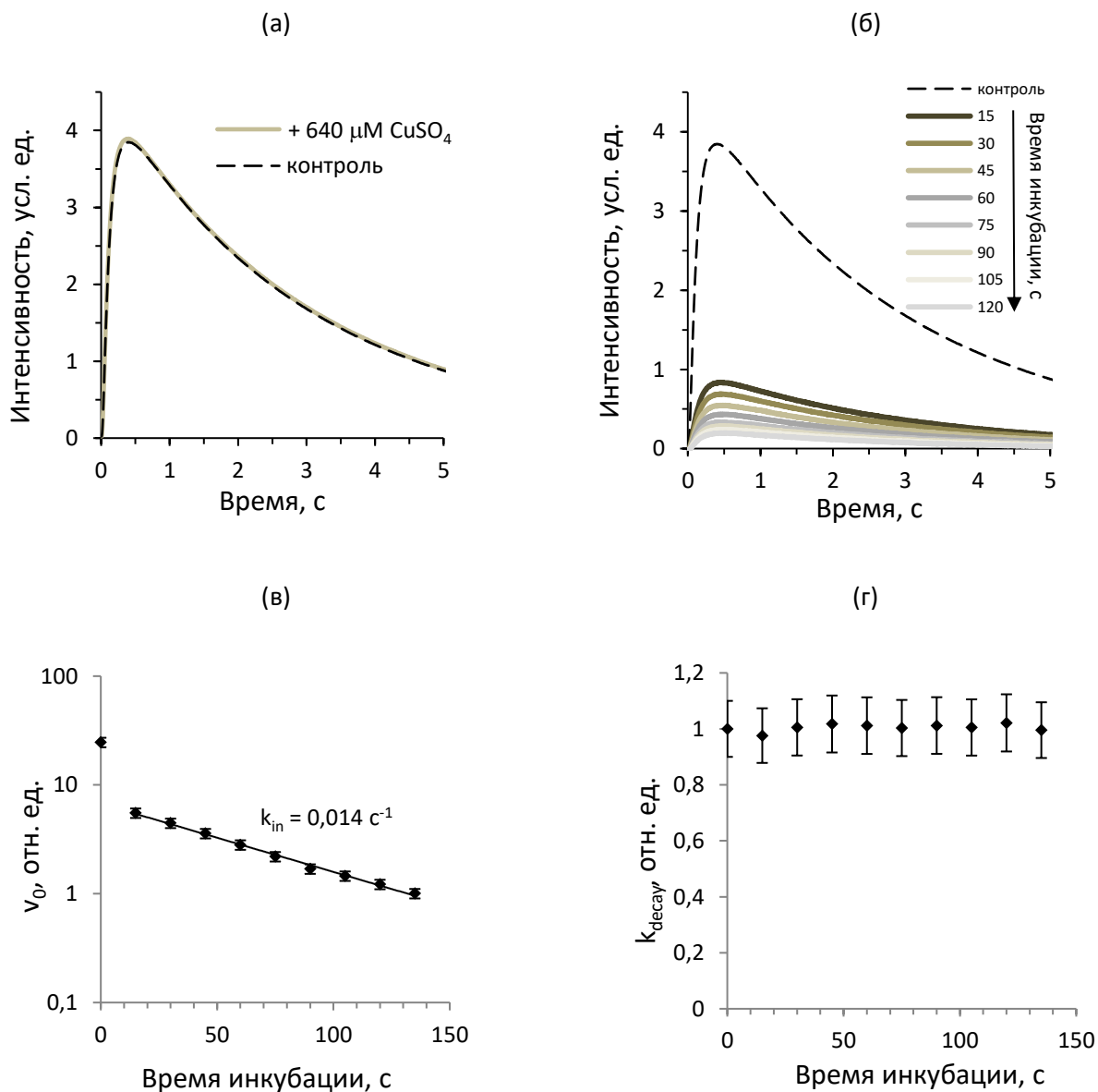


Рисунок 5.5 – Кинетика реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, в присутствии сульфата меди (II): (а) после инкубации $1280 \mu\text{M CuSO}_4$ с субстратами; (б) после инкубации $0,62 \mu\text{M CuSO}_4$ с люциферазой; зависимость начальной скорости (в) и константы спада (г) от времени инкубации фермента с CuSO_4 . Концентрации в измерительной ячейке: $1 \mu\text{M}$ люциферазы, $15 \mu\text{M}$ восстановленного FMN и $50 \mu\text{M}$ деканала.

При этом количество испускаемых квантов света быстро снижается с течением времени инкубации, что не позволяет определить параметр IC_{50} (концентрацию, ингибирующую активность на 50%). По изменению параметра v_0 (Рисунок 5.5, в) была оценена константа скорости инактивации, полученное значение составило $0,014 \text{ с}^{-1}$.

Также было получено, что время инкубации не оказывает влияния на константу спада свечения k_{decay} (Рисунок 5.5, г). Известно, что ионы меди инактивируют ферменты, взаимодействуя с цистеиновыми и гистидиновыми аминокислотными остатками [166]. Можно предположить, что сульфат меди (II) инактивирует люциферазу с течением времени посредством подобного механизма. При этом вероятно это происходит из-за структурных изменений фермента, так как скорость катализа ($\sim k_{\text{decay}}$) не изменяется.

Ингибиторный ферментативный анализ с использованием биферментной системы люцифераза + NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза был также применен для прогнозирования потенциальной токсичности многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) [167]. Параметры ингибирования для этого ксенобиотика были определены как: $IC_{50} = 0,012 \text{ мг/л}$ и $IC_{20} = 0,004 \text{ мг/л}$. Для того, чтобы оценить вклад ингибирования люциферазы в эффект на биферментную систему, были получены кинетические кривые реакции катализируемой бактериальной люциферазой *P. leiognathi*, в присутствии МУНТ (Рисунок 5.6).

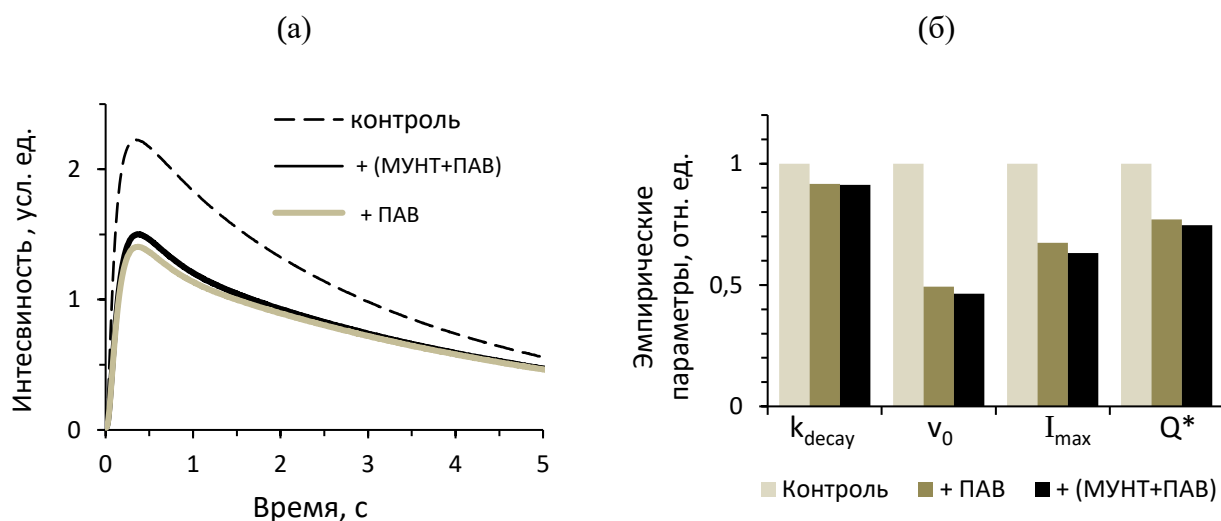


Рисунок 5.6 – Кинетика реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, в присутствии многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ, 0,125 мг/л) и лаурилсульфата натрия (ПАВ, 0,0125%): (а) кинетические кривые, полученные после предварительного добавления МУНТ и/или ПАВ к раствору субстратов; (б) эмпирические параметры кинетических кривых. Концентрации в измерительной ячейке: 1 $\mu\text{М}$ люциферазы, 15 $\mu\text{М}$ восстановленного FMN и 50 $\mu\text{М}$ деканала.

Исходную суспензию нанотрубок готовили в 1%-м растворе лаурилсульфата натрия и добавляли в раствор субстратов перед запуском реакции. Аналогично, были получены кинетические кривые биолюминесценции при добавлении в раствор субстратов только лаурилсульфата натрия в той же концентрации, как в эксперименте с МУНТ. Полученные характеристики сравнивали с результатами контрольного измерения кинетики в буферном растворе (Рисунок 5.6, а). Было получено, что в присутствии 0,0125% лаурилсульфата натрия (или 0,125 г/л или $4,3 \cdot 10^{-4}$ М) наблюдается уменьшение максимальной интенсивности биолюминесценции на ~ 40%. При этом МУНТ в максимально возможной в данных условиях концентрации 0,125 мг/л не демонстрирует значительного дополнительного ингибирующего эффекта по сравнению с влиянием ПАВ (Рисунок 5.6, б).

Полученные данные говорят о сильном ингибировании реакции ПАВ, применяемым для приготовления суспензии многостенных углеродных нанотрубок. При использованных концентрациях влияние МУНТ как таковых на биолюминесцентную реакцию можно назвать пренебрежимо малым по сравнению с влиянием сопутствующего ПАВ. Наши результаты согласуются с последними данными Сутормина с соавторами [168], показавшими, что IC_{50} для лаурилсульфата натрия по отношению к биферментной системе бактериальная люцифераза+NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза составляет 10^{-5} М. Большая чувствительность биферментной системы к этому ПАВ, вероятно, объясняется дополнительным влиянием на активность оксидоредуктазы, что снижает концентрацию субстрата люциферазы – восстановленного флавина.

Влияние радионуклидов на кинетику бактериальной люциферазы

В работе [121] был продемонстрирован стохастический активирующий эффект радиоактивности, созданной различными концентрациями тритиевой воды, на интенсивность биолюминесценции светящихся бактерий и биферментной системы люцифераза+NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза. Был сделан вывод, что сопряженные ферментативные реакции участвуют в адаптивном ответе бактерий.

Для того, чтобы определить роль люциферазы в наблюдавшемся эффекте на биферментную систему, изучали её активность после инкубации фермента в растворах тритиевой воды при различной удельной радиоактивности [121]. Регистрировали кинетические кривые биолюминесценции в буфере (контроль) и после инкубации с тритиевой водой. Примеры полученных кинетических кривых представлены на рисунке 5.7, а. Установлено, что тритий в небольшой степени увеличивает интенсивность биолюминесценции, испускаемой в ходе люциферазной реакции (Рисунок 5.7, б). Монотонной зависимости интегральной интенсивности реакции от

радиоактивности раствора не наблюдается. Средние значения Q^* слегка превышают контрольное значение во всем используемом диапазоне радиоактивности тритиевой воды; отклонения от контроля не превышали 20%. Следовательно, тритиевая вода не приводит к значительному увеличению интегральной интенсивности биolumинесценции в реакции бактериальной люциферазы по сравнению с нерадиоактивными (контрольными) образцами.

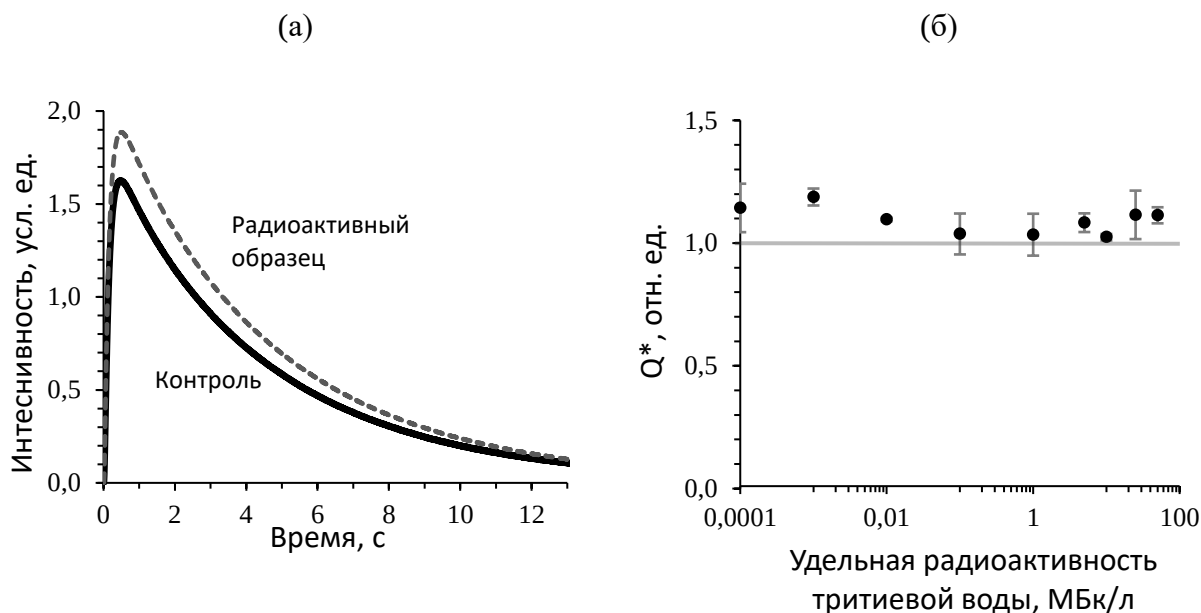


Рисунок 5.7 – Кинетика реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, после 5 мин инкубации фермента с тритиевой водой: (а) кинетические кривые, полученные при удельной радиоактивности тритиевой воды 5 МБк/л; (б) интегральная интенсивность Q^* после инкубации в растворах с различной удельной радиоактивностью тритиевой воды. Концентрации в измерительной ячейке: 1 μM люциферазы, 15 μM восстановленного FMN и 50 μM деканала. Горизонтальная линия показывает значение параметра для буфера.

Дополнительно варьировали время инкубации бактериальной люциферазы с тритиевой водой (2 МБк/л) от 1 до 87 часов. Было получено, что изменение времени инкубации не оказывает значительного влияния на кинетические параметры люциферазной реакции. Таким образом, была продемонстрирована независимость ферментативной активности люциферазы от радиоактивности тритиевой воды и времени радиационного воздействия. Тем не менее, судя по всему это увеличение вносит вклад в активацию биolumинесценции сопряженной биферментной системы бактериальная люцифераза+NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза.

Влияние присутствия NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы на эффекты вязких сред на активность бактериальной люциферазы

Ранее было установлено, что активность оксидоредуктазы, функционирующей в сопряжении с бактериальной люциферазой, изменяется по сравнению с активностью, проявляющейся в моноферментной системе [168]. Одним из возможных механизмов этого эффекта было названо образование белок-белкового комплекса между ферментами. На данном этапе работы мы изучили обратный эффект – изменяет ли присутствие NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы кинетику люциферазы в вязких средах с глицерином и сахарозой. Было получено, что присутствие второго фермента слабо сказывается на зависимостях кинетических параметров реакции, катализируемой люциферазой, от вязкости среды (Рисунок 5.8).

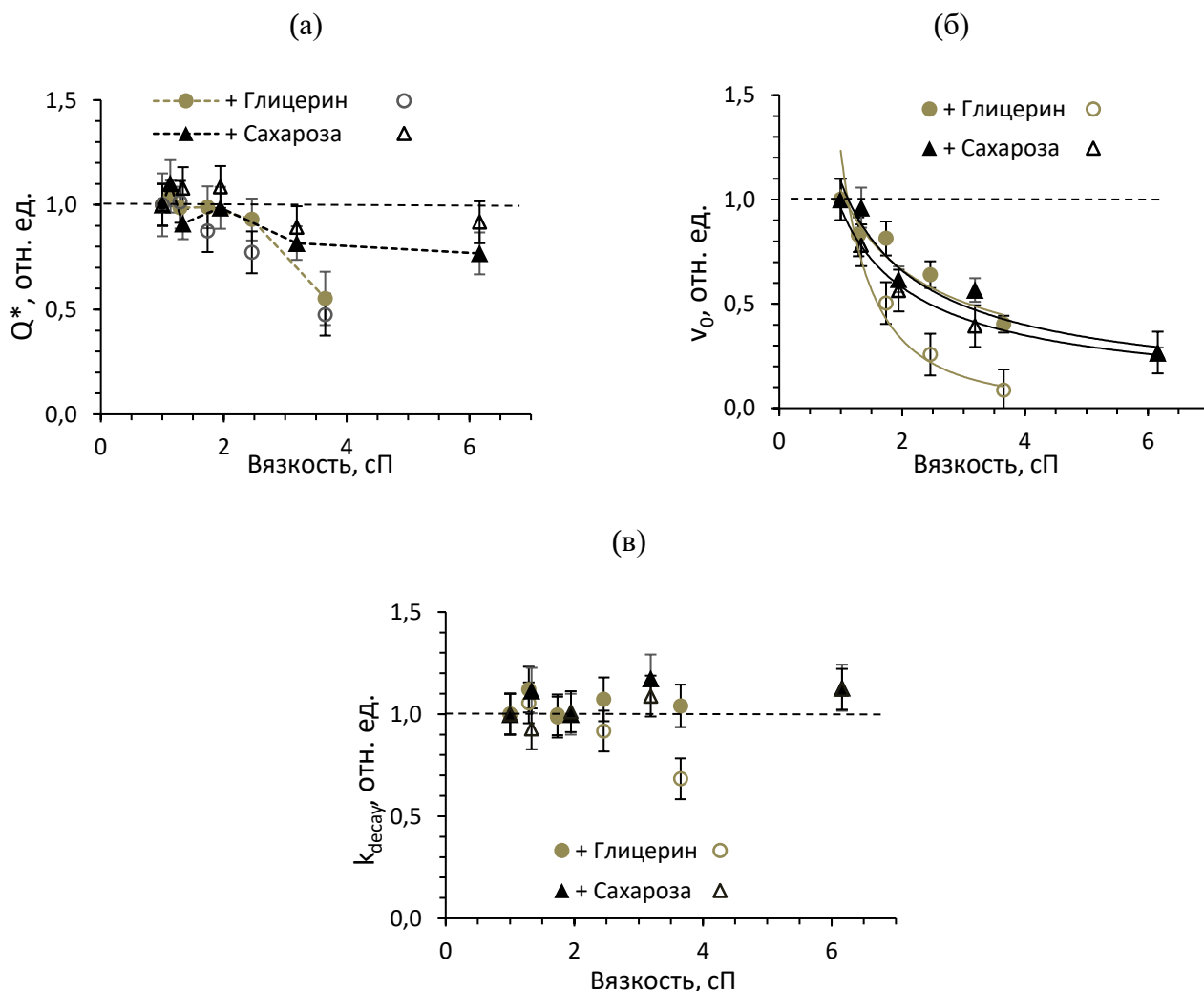


Рисунок 5.8 – Кинетические параметры реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, в присутствии NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы: (а) интегральная интенсивность, (б) начальная скорость реакции, (в) константа спада биолюминесценции. Данные нормированы на значения в буфере (вязкость 1 сП). Горизонтальные штриховые линии соответствует значению параметра в буфере, штриховые линии, соединяющие точки, проведены для наглядности. Пустые маркеры показывают параметры кинетики в отсутствие оксидоредуктазы [126]. Концентрации в измерительной ячейке: 1 μ M люциферазы, 15 μ M восстановленного FMN и 50 μ M деканала.

Аналогично полученным ранее данным (в отсутствие оксидоредуктазы) интегральная интенсивность снижается на <20% в растворах сахарозы и на <55% в растворах глицерина. В растворах сахарозы константа спада свечения k_{decay} и начальная скорость v_0 также демонстрирует аналогичную зависимость от вязкости в присутствии и отсутствии редуктазы. Для растворов глицерина присутствие редуктазы несколько ослабляет эффект на параметр v_0 с ростом вязкости, и полностью снимает эффект на k_{decay} при 40%-м содержании.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии влияния оксидоредуктазы на функционирование люциферазы, что говорит об отсутствии белок-белкового комплекса между ферментами. Тем не менее, обратная ситуация оказалась другой – было обнаружено усиление активности NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы в присутствии люциферазы в среде с глицерином [169]. При этом активация наблюдается в растворах глицерина, но не сахарозы. Аналогичные закономерности для вязкостной зависимости были получены в случае сопряженной ферментативной реакции люцифераза+NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза [169]. Поскольку формирование белок-белкового комплекса можно признать маловероятным, возможен следующий кинетический механизм влияния люциферазы на активность редуктазы в средах с глицерином: в присутствии небольших концентраций данного соразтворителя происходит дестабилизация пероксифлавинового интермедиата [123], что приводит к увеличению скорости возвращения в систему окисленного FMN, который в последствии используется оксидоредуктазой как субстрат.

5.3 Заключение к главе

Было изучено влияние различных температур на структуру и функцию «быстрой» люциферазой *Photobacterium leiognathi* и «медленной» *Vibrio harveyi* в присутствии сахарозы. Результаты исследования показали, что «быстрая» люцифераза *P. leiognathi* термолabile и проявляет максимальную активность в более узком диапазоне температур, чем «медленная» люцифераза *V. harveyi*. Последняя слабо чувствительна к изменению температуры и сохраняет активность до 35 °C. Однако люцифераза *P. leiognathi* обеспечивает вдвое более высокое значение интегральной интенсивности на один оборот в оптимальных условиях. При более низких температурах (<15 °C) активность «быстрого» фермента также значительно выше по сравнению с «медленным». Таким образом, люцифераза с быстрой кинетикой распада проявляет свойства холодаадаптированных ферментов, тогда как люцифераза с медленной кинетикой более устойчива к высоким температурам. Все это отражает известную взаимосвязь между активностью и структурной стабильностью ферментов, предполагающую, что более стабильные белки не могут обеспечить высокую скорость катализа из-за жесткости структуры. Исследования влияния сахарозы на стабильность и активность двух бактериальных люцифераз показали, что сахароза

не оказывает стабилизирующего эффекта на активность обоих ферментов при «неоптимальных» температурах, но может защитить белки от термической денатурации. Примечательно, что влияние сахарозы на механизмы денатурации двух люцифераз, по-видимому, различно и требует более подробного изучения.

Также в данной главе рассмотрены результаты использования кинетического анализа реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, для изучения механизмов влияния на ферментативные биотестовые системы таких неблагоприятных факторов, как токсиканты (ионы меди Cu^{2+} , многостенные углеродные нанотрубки) и радионуклиды. Кроме этого, представлены исследования влияния присутствия второго фермента – NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы на вязкостные зависимости реакции, катализируемой бактериальной люциферазой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование было направлено на расшифровку механизмов влияния вязких сред на биолюминесцентную реакцию бактерий. Для этого с помощью математического моделирования были определены скорости отдельных стадий реакции в вязких средах, созданных добавлением 7-ми сорастворителей с разным молекулярным размером. Анализ изменения скоростей отдельных стадий при вариации вязкости среды позволил сделать следующие выводы:

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

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

5) Низкомолекулярные сорастворители 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 сорастворителя 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 термоинактивацию 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 4а-(гидро)пероксифлавина, выполняют многие важные функции как у прокариот, так и у эукариот, следовательно их стабилизация вязкой микросредой

также может быть одним из биологических механизмов адаптации живых клеток к неблагоприятным условиям.

В работе впервые предложена и использована математическая модель кинетики биолюминесцентной реакции, катализируемой «быстрой» люциферазой *Photobacterium leiognathi*. Она оказалась отлична от более ранних моделей, предложенных для реакции «медленной» люциферазы *Vibrio 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 светоизлучения 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пучков Е.О. Внутриклеточная вязкость: методы измерения и роль в метаболизме / О. Е. Пучков // Биологические мембраны. – 2014. – Т. 31. – №. 1. – С. 3-13.
2. Sitnitsky A.E. Model for solvent viscosity effect on enzymatic reactions / A.E. Sitnitsky // Chemical Physics. – 2010. – Vol. 369. – №. 1. – P. 37-42.
3. 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.
4. Hashimoto Y. Measurement of cytoplasmic viscosity by fluorescence polarization in phytohemagglutinin stimulated and unstimulated human peripheral lymphocytes. / Y. Hashimoto, N. Shinozaki // Journal of Histochemistry & Cytochemistry. – 1988. – Vol. 36. – №. 6. – P. 609-613.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Parke W.C. Biophysics: A student's guide to the physics of the life sciences and medicine. / W. C. Parke – Springer Nature, 2020.
9. Irgens F. Rheology and non-newtonian fluids. / F. Irgens – New York : Springer International Publishing, 2014. – Vol. 1.
10. Rivas G., Biochemical reactions in cytomimetic media / G. Rivas, A. P. Minton //Frontiers in Molecular Biosciences. – 2020. – Vol. 6. – P. 145.
11. 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.
12. Silverstein T.P. Effects of macromolecular crowding on biochemical systems / T.P. Silverstein, K. Slade //Journal of Chemical Education. – 2019. – Vol. 96. – №. 11. – P. 2476-2487.
13. Nakashima K.K. Biomolecular chemistry in liquid phase separated compartments / K. K. Nakashima, M.A. Vibhute, E. Spruijt // Frontiers in molecular biosciences. – 2019. – Vol. 6. – P. 21.

14. Luby-Phelps K. Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area / K. Luby-Phelps // *International review of cytology*. – 1999. – Vol. 192. – P. 189-221.
15. Lakowicz J.R. (ed.). Topics in fluorescence spectroscopy: nonlinear and two-photon-induced fluorescence. / J. R. Lakowicz – Springer Science & Business Media, 2006. – Vol. 5.
16. Hubley M.J. Reaction-diffusion analysis of the effects of temperature on high-energy phosphate dynamics in goldfish skeletal muscle / M. J. Hubley, B. R. Locke, T. S. Moerland // *The Journal of experimental biology*. – 1997. – Vol. 200. – №. 6. – P. 975-988.
17. Dix J.A. Mapping of fluorescence anisotropy in living cells by ratio imaging. Application to cytoplasmic viscosity / J. A. Dix, A.S. Verkman // *Biophysical journal*. – 1990. – Vol. 57. – №. 2. – P. 231-240.
18. Puchkov E.O. Brownian motion of polyphosphate complexes in yeast vacuoles: characterization by fluorescence microscopy with image analysis / E.O. Puchkov // *Yeast*. – 2010. – Vol. 27. – №. 6. – P. 309-315.
19. Papadopoulos S. Protein diffusion in living skeletal muscle fibers: dependence on protein size, fiber type, and contraction / S. Papadopoulos, K. D. Jürgens, G. Gros // *Biophysical journal*. – 2000. – Vol. 79. – №. 4. – P. 2084-2094.
20. Bicknese S. Cytoplasmic viscosity near the cell plasma membrane: measurement by evanescent field frequency-domain microfluorimetry / S. Bicknese, N. Periasamy, S.B. Shohet, A.S. Verkman // *Biophysical journal*. – 1993. – Vol. 65. – №. 3. – P. 1272-1282.
21. Richardson W.D. Introducing proteins into culture animal cells. / W.D. Richardson // *J. Cell Sci*. – 1988. - Vol. 91, P. 319–322.
22. Verkman A. S. Diffusion in cells measured by fluorescence recovery after photobleaching / A.S. Verkman // *Methods in enzymology*. – 2003. – Vol. 360. – P. 635-648.
23. Chambers J. E. An optical technique for mapping microviscosity dynamics in cellular organelles / J. E. Chambers, M. Kubánková, R. G. Huber, I. López-Duarte, E. Avezov, P. J. Bond, S.J. Marciniak, M. K. Kuimova // *Acs Nano*. – 2018. – Vol. 12. – №. 5. – P. 4398-4407.
24. Pocker Y., Enzyme kinetics in solvents of increased viscosity. Dynamics aspects of carbonic anhydrase catalysis / Y. Pocker, N. Janjic // *Biochemistry*. – 1987. – Vol. 26. – №. 9. – P. 2597-2606.
25. Damjanovich S. Effect of glycerol on some kinetic parameters of phosphorylase b / S. Damjanovich, J. Bot, B. Somogyi, J. Sümegi // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*. – 1972. – Vol. 284. – №. 1. – P. 345-348.
26. Quaye J. A. Kinetic solvent viscosity effects uncover an internal isomerization of the enzyme-substrate complex in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 NADH: Quinone oxidoreductase / J. A. Quaye, J. Ball, G. Gadda // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2022. – Vol. 727. – P. 109342.

27. Neri L. Influence of water activity and molecular mobility on peroxidase activity in salt and sorbitol–maltodextrin systems / L. Neri, P. Pittia, G. Bertolo, D. Torreggiani, G. Sacchetti // *Journal of food engineering*. – 2010. – Vol. 101. – №. 3. – P. 289-295.
28. Brouwer A. C., Investigation of diffusion-limited rates of chymotrypsin reactions by viscosity variation / A. C. Brouwer, J. F. Kirsch // *Biochemistry*. – 1982. – Vol. 21. – №. 6. – P. 1302-1307.
29. Sampedro J. G., Kramers' theory and the dependence of enzyme dynamics on trehalose-mediated viscosity / J. G. Sampedro, M. A. Rivera-Moran, S. Uribe-Carvajal // *Catalysts*. – 2020. – Vol. 10. – №. 6. – P. 659.
30. Gavish B. Viscosity-dependent structural fluctuations in enzyme catalysis / B. Gavish, M. M. Werber // *Biochemistry*. – 1979. – Vol. 18. – №. 7. – P. 1269-1275.
31. Gadda G., Kinetic solvent viscosity effects as probes for studying the mechanisms of enzyme action / G. Gadda, P. Sobrado // *Biochemistry*. – 2018. – Vol. 57. – №. 25. – P. 3445-3453.
32. Hagen S.J. Solvent viscosity and friction in protein folding dynamics / S.J. Hagen // *Current Protein and Peptide Science*. – 2010. – Vol. 11. – №. 5. – P. 385-395.
33. Lim W. A. Triosephosphate isomerase catalysis is diffusion controlled. Appendix: Analysis of triose phosphate equilibria in aqueous solution by phosphorus-31 NMR / W. A. Lim, R. T. Raines, J. R. Knowles // *Biochemistry*. – 1988. – Vol. 27. – №. 4. – P. 1165-1167.
34. Tsong T. Y. Viscosity-dependent conformational relaxation of ribonuclease A in the thermal unfolding zone / T. Y. Tsong // *Biochemistry*. – 1982. – Vol. 21. – №. 7. – P. 1493-1498.
35. Kramers H. A. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions / H. A. Kramers // *Physica*. – 1940. – Vol. 7. – №. 4. – P. 284-304.
36. Luby-Phelps, K. The physical chemistry of cytoplasm and its influence on cell function: An update. / K. Luby-Phelps // *Molecular biology of the cell*. – 2013. – Vol. 24. – №. 17. – P. 2593-2596.
37. Jacob M. Protein folding as a diffusional process / M. Jacob, F.X. Schmid // *Biochemistry*. – 1999. – Vol. 38. – №. 42. – P. 13773-13779.
38. Frauenfelder H. et al. A unified model of protein dynamics / H. Frauenfelder, G. Chen, J. Berendzen, P. W. Fenimore, H. Jansson, B. H. McMahon, I. R. Stroe, J. Swenson, R. D. Young // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 106. – №. 13. – P. 5129-5134.
39. Bérczi A. Control of the activity of plant plasma membrane MgATPase by the viscosity of the aqueous phase / A. Bérczi, I. M. Møller // *Physiologia Plantarum*. – 1993. – Vol. 89. – №. 2. – P. 409-415.
40. Hernández-Meza J. M. Trehalose mediated inhibition of lactate dehydrogenase from rabbit muscle. The application of Kramers' theory in enzyme catalysis / J.M. Hernández-Meza, J.G. Sampedro // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2018. – Vol. 122. – №. 15. – P. 4309-4317.

41. Schlee S. Relationship of catalysis and active site loop dynamics in the ($\beta\alpha$) 8-barrel enzyme indole-3-glycerol phosphate synthase / S. Schlee, T. Klein, M. Schumacher, J. Nazet, R. Merkl H.J. Steinhoff, R. Sterner // *Biochemistry*. – 2018. – Vol. 57. – №. 23. – P. 3265-3277.
42. 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.
43. Frauenfelder H. The energy landscapes and motions of proteins / S.G. Sligar, P.G. Wolynes // *Science*. – 1991. – Vol. 254. – №. 5038. – P. 1598-1603.
44. Sampedro, J.G. Thermal inactivation of the plasma membrane H^+ -ATPase from *Kluyveromyces lactis*. Protection by trehalose. / J.G. Sampedro, P. Cortés, R.A. Muñoz-Clares, A. Fernández, S. Uribe // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. – 2001. – Vol. 1544. – №. 1-2. – P. 64-73.
45. Magazù S. Diffusive dynamics of water in the presence of homologous disaccharides: A comparative study by quasi elastic neutron scattering. IV / S. Magazù, V. Villari, P. Migliardo, G. Maisano, M. T. F. Telling // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2001. – Vol. 105. – №. 9. – P. 1851-1855.
46. Soper A. K. et al. Trehalose in water revisited / A. K. Soper, M. A. Ricci, F. Bruni, N. H. Rhys, S.E. McLain // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2018. – Vol. 122. – №. 29. – P. 7365-7374.
47. Shirey C. Role of Ser-257 in the sliding mechanism of NADP(H) in the reaction catalyzed by the *Aspergillus fumigatus* flavin-dependent ornithine N5-monooxygenase SidA / C. Shirey, S. Badieyan, P. Sobrado // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – №. 45. – P. 32440-32448.
48. van der Kamp M. W. Combined quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) methods in computational enzymology / M.W. van der Kamp, A.J. Mulholland // *Biochemistry*. – 2013. – Vol. 52. – №. 16. – P. 2708-2728.
49. Ouedraogo D. Importance of loop L1 dynamics for substrate capture and catalysis in *Pseudomonas aeruginosa* D-arginine dehydrogenase / D. Ouedraogo, M. Souffrant, S. Vasquez, D. Hamelberg, G. Gadda // *Biochemistry*. – 2017. – Vol. 56. – №. 19. – P. 2477-2487.
50. Berg O. G. Diffusion-controlled macromolecular interactions / O.G. Berg, von Hippel P. H. // *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*. – 1985. – Vol. 14. – №. 1. – P. 131-158.
51. Karsten W. E. Inverse solvent isotope effects in the NAD-malic enzyme reaction are the result of the viscosity difference between D_2O and H_2O : Implications for solvent isotope effect studies / W. E. Karsten, C. J. Lai, P. F. Cook // *Journal of the American Chemical Society*. – 1995. – Vol. 117. – №. 22. – P. 5914-5918.

52. Edward J. T. Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation / J. T. Edward // Journal of chemical education. – 1970. – Vol. 47. – №. 4. – P. 261.
53. Matsue S. Influence of water activity and aqueous solvent ordering on enzyme kinetics of alcohol dehydrogenase, lysozyme, and β -galactosidase / S. Matsue, O. Miyawaki // Enzyme and microbial technology. – 2000. – Vol. 26. – №. 5-6. – P. 342-347.
54. Lee S. B. Effect of water activity on enzyme hydration and enzyme reaction rate in organic solvents / S. B. Lee, K. J. Kim // Journal of fermentation and bioengineering. – 1995. – Vol. 79. – №. 5. – P. 473-478.
55. Bussiere G. Confectionery and water activity determination of aw by calculation / G. Bussiere, M. Serpelloni // Properties of Water in Foods: In Relation to Quality and Stability. – 1985. – Vol. 90. – P. 627-645.
56. Miyawaki O. Activity and activity coefficient of water in aqueous solutions and their relationships with solution structure parameters / O. Miyawaki, A. Saito, T. Matsuo, K. Nakamura // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 1997. – Vol. 61. – №. 3. – P. 466-469.
57. Timson D.J. The roles and applications of chaotropes and kosmotropes in industrial fermentation processes / D.J. Timson // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2020. – Vol. 36. – №. 6. – P. 89.
58. Saito A. Dielectric relaxation of aqueous solution with low-molecular-weight nonelectrolytes and its relationship with solution structure / A. Saito, O. Miyawaki, K. Nakamura // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 1997. – Vol. 61. – №. 11. – P. 1831-1835.
59. Nozaki Y. The solubility of amino acids and related compounds in aqueous urea solutions / Y. Nozaki, C. Tanford // Journal of Biological Chemistry. – 1963. – Vol. 238. – №. 12. – P. 4074-4081.
60. Poklar N. Thermodynamics of denaturation of α -chymotrypsinogen A in aqueous urea and alkylurea solutions / N. Poklar, G. Vesnaver, S. Lapanje // Journal of protein chemistry. – 1995. – Vol. 14. – P. 709-719.
61. Kuznetsova I. M. What macromolecular crowding can do to a protein / I.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov, V.N. Uversky // International journal of molecular sciences. – 2014. – Vol. 15. – №. 12. – P. 23090-23140.
62. Rotta M. Observed crowding effects on *Mycobacterium tuberculosis* 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase enzyme activity are not due to excluded volume only / M. Rotta, L. F. Timmers, C. Sequeiros-Borja, C. V. Bizarro, O. N. de Souza, D. S. Santos, L. A. Basso // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – №. 1. – P. 1-14.
63. Чеботарева Н. А. Влияние молекулярного краудинга на ферменты гликогенолиза / Н. А. Чеботарева // Успехи биологической химии. – 2007. – Т. 47. – С. 233-258.

64. Chebotareva N. A. Interaction of Hsp27 with native phosphorylase kinase under crowding conditions / N. A. Chebotareva, V. F. Makeeva, S. G. Bazhina, T. B. Eronina, N. B. Gusev, B. I. Kurganov // *Macromolecular bioscience*. – 2010. – Vol. 10. – №. 7. – P. 783-789.
65. Schavemaker P. E. How important is protein diffusion in prokaryotes? / P.E. Schavemaker, A.J. Boersma, B. Poolman // *Frontiers in molecular biosciences*. – 2018. – Vol. 5. – P. 93
66. Phillips, R. *Physical biology of the cell*. / R. Phillips, J. Kondev, J. Theriot - New York, NY: Garland Science, 2009.
67. Schavemaker P. E. Ribosome surface properties may impose limits on the nature of the cytoplasmic proteome / P.E. Schavemaker, W.M. Śmigiel, B. Poolman // *Elife*. – 2017. – Vol. 6. – P. e30084.
68. Schreiber G. Fundamental aspects of protein–protein association kinetics / G. Schreiber, G. Haran, H. X. Zhou // *Chemical reviews*. – 2009. – Vol. 109. – №. 3. – P. 839-860.
69. Alsallaq R. Electrostatic rate enhancement and transient complex of protein–protein association / R. Alsallaq, H.X. Zhou // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2008. – Vol. 71. – №. 1. – P. 320-335.
70. Li G. W. Central dogma at the single-molecule level in living cells / G.W. Li, X.S. Xie // *Nature*. – 2011. – Vol. 475. – №. 7356. – P. 308-315.
71. Soh S. Why cells are microscopic: a transport-time perspective / S. Soh, M. Banaszak, K. Kandere-Grzybowska, B.A. Grzybowski // *The journal of physical chemistry letters*. – 2013. – Vol. 4. – №. 6. – P. 861-865.
72. Loose M., Kruse K., Schwille P. Protein self-organization: lessons from the min system / Kruse K., Schwille P. // *Annual review of biophysics*. – 2011. – Vol. 40. – P. 315-336.
73. Lipkow K. Model for protein concentration gradients in the cytoplasm / K. Lipkow, D.J. Odde // *Cellular and molecular bioengineering*. – 2008. – Vol. 1. – P. 84-92.
74. Salvadó Z. et al. Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces* / Z. Salvadó, F.N. Arroyo-López, J.M. Guillamón, G. Salazar, A. Querol, E. Barrio // *Applied and environmental microbiology*. – 2011. – Vol. 77. – №. 7. – P. 2292-2302.
75. Sinensky M. Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli* / M. Sinensky // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1974. – Vol. 71. – №. 2. – P. 522-525.
76. Franzmann T. M. Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness / T.M. Franzmann, M. Jahnel, A. Pozniakovsky, J. Mahamid, A. S. Holehouse, E. Nüske, D. Richter, W. Baumeister, S.W. Grill, R.V. Pappu, A.A. Hyman, S. Alberti // *Science*. – 2018. – Vol. 359. – №. 6371. – P. 5654.

77. Munder M. C. A pH-driven transition of the cytoplasm from a fluid-to a solid-like state promotes entry into dormancy / M.C. Munder, D. Midtvedt, T. Franzmann, E. Nüske, O. Otto, M. Herbig, E. Ulbricht, P. Müller, A. Taubenberger, S. Maharana, L. Malinowska, D. Richter, J. Guck, V. Zaburdaev, S. Alberti // *Elife*. – 2016. – Vol. 5. – P. e09347.
78. Hastings J. W. Bacterial bioluminescence / J.W. Hastings, K.H. Nealson // *Annual review of microbiology*. – 1977. – Vol. 31. – №. 1. – P. 549-595.
79. Szpilewska H. Experimental evidence for the physiological role of bacterial luciferase in the protection of cells against oxidative stress / H. Szpilewska, A. Czyż, G. Wgrzyn // *Current microbiology*. – 2003. – Vol. 47. – P. 379-382.
80. 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.
81. Tinikul R. Bacterial luciferase: molecular mechanisms and applications / R. Tinikul, P. Chunthaboon, J. Phonbuppha, T. Paladkong // *The Enzymes*. – Academic Press, 2020. – Vol. 47. – P. 427-455.
82. Nealson K. H. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance / K.H. Nealson, J.W. Hastings // *Microbiological reviews*. – 1979. – Vol. 43. – №. 4. – P. 496-518.
83. 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.
84. Campbell Z. T. Crystal structure of the bacterial luciferase/flavin complex provides insight into the function of the β subunit / Z.T. Campbell, A. Weichsel, W.R. Montfort, T.O. Baldwin, // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48. – №. 26. – P. 6085-6094.
85. Xi L. Elicitation of an oxidase activity in bacterial luciferase by site-directed mutation of a noncatalytic residue / L. Xi, K. W. Cho, M. E. Herndon, S.C. Tu // *Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – Vol. 265. – №. 8. – P. 4200-4203.
86. Fried A. Affinity labeling of the aldehyde site of bacterial luciferase / A. Fried, S.C. Tu // *Journal of Biological Chemistry*. – 1984. – Vol. 259. – №. 17. – P. 10754-10759.
87. Abu-Soud H. M. Kinetic destabilization of the hydroperoxy flavin intermediate by site-directed modification of the reactive thiol in bacterial luciferase / H.M. Abu-Soud, A.C. Clark, W.A. Francisco, T.O. Baldwin, F.M. Raushel, // *Journal of Biological Chemistry*. – 1993. – Vol. 268. – №. 11. – P. 7699-7706.
88. Li C. H. Active site hydrophobicity is critical to the bioluminescence activity of *Vibrio harveyi* luciferase / C.H. Li, S.C. Tu // *Biochemistry*. – 2005. – Vol. 44. – №. 39. – P. 12970-12977.

89. Van Berkel W. Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts / W.J.H. Van Berkel, N. M. Kamerbeek, M.W. Fraaije // Journal of biotechnology. – 2006. – Vol. 124. – №. 4. – P. 670-689.
90. Palfey B. A. Control of catalysis in flavin-dependent monooxygenases / B.A. Palfey, C.A. McDonald // Archives of biochemistry and biophysics. – 2010. – Vol. 493. – №. 1. – P. 26-36.
91. Sucharitakul J. Mechanisms of reduced flavin transfer in the two-component flavin-dependent monooxygenases / J. Sucharitakul, R. Tinikul, P. Chaiyen // Archives of biochemistry and biophysics. – 2014. – Vol. 555. – P. 33-46.
92. Campbell Z. T. Fre is the major flavin reductase supporting bioluminescence from *Vibrio harveyi* luciferase in *Escherichia coli* / Z.T. Campbell, T.O. Baldwin // Journal of Biological Chemistry. – 2009. – Vol. 284. – №. 13. – P. 8322-8328.
93. Li X., Tu S. C. Activity coupling of *Vibrio harveyi* luciferase and flavin reductase (FRP): Oxygen as a probe / X. Li, S.C. Tu // Archives of biochemistry and biophysics. – 2006. – Vol. 454. – №. 1. – P. 26-31.
94. Suadee C. Luciferase from *Vibrio campbellii* is more thermostable and binds reduced FMN better than its homologues / C. Suadee, S. Nijvipakul, J. Svasti, B. Entsch, D. P. Ballou, P. Chaiyen // Journal of biochemistry. – 2007. – Vol. 142. – №. 4. – P. 539-552.
95. Nijvipakul S. LuxG is a functioning flavin reductase for bacterial luminescence / S. Nijvipakul, J. Wongratana, C. Suadee, B. Entsch, D.P. Ballou, P. Chaiyen // Journal of bacteriology. – 2008. – Vol. 190. – №. 5. – P. 1531-1538.
96. Tinikul R. The transfer of reduced flavin mononucleotide from LuxG oxidoreductase to luciferase occurs via free diffusion / R. Tinikul, W. Pitsawong, J. Sucharitakul, S. Nijvipakul, D.P. Ballou, P. Chaiyen // Biochemistry. – 2013. – Vol. 52. – №. 39. – P. 6834-6843.
97. Lee, John. Bioluminescence, the Nature of the Light / John Lee. - University of Georgia, 2020.
98. 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.
99. 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.
100. Watanabe T. Studies on Luciferase from *Photobacterium phosphoreum*. VHI. FMN-H₂O₂ Initiated Bioluminescence and the Thermodynamics of the Elementary Steps of the Luciferase Reaction / T. Watanabe, T. Nakamura // The Journal of Biochemistry. – 1976. – Vol. 79. – №. 3. – P. 489-495.

101. AbouKhair N. K., Ziegler M. M., Baldwin T. O. Bacterial luciferase: demonstration of a catalytically competent altered conformational state following a single turnover / N. K. AbouKhair, M. M. Ziegler, T. O. Baldwin // *Biochemistry*. – 1985. – Vol. 24. – №. 15. – P. 3942-3947.
102. Vervoort J. Identifications of the true carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrum of the stable intermediate II in bacterial luciferase / J. Vervoort, F. Muller, J. Lee, W.A. Van den Berg, C.T. Moonen // *Biochemistry*. – 1986. – Vol. 25. – №. 24. – P. 8062-8067.
103. Ghisla S. Structure of the oxygen adduct intermediate in the bacterial luciferase reaction: ¹³C nuclear magnetic resonance determination / S. Ghisla, J. W. Hastings, V. Favaudon, J.M. Lhoste // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1978. – Vol. 75. – №. 12. – P. 5860-5863.
104. Suzuki K. O₂ incorporation into a long-chain fatty acid during bacterial luminescence / K. Suzuki, T. Kaidoh, M. Katagiri, T. Tsuchiya // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 1983. – Vol. 722. – №. 2. – P. 297-301.
105. Eberhard A. A postulated mechanism for the bioluminescent oxidation of reduced flavin mononucleotide / A. Eberhard, J.W. Hastings // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1972. – Vol. 47. – №. 2. – P. 348-353.
106. Raushel F.M. Proposed mechanism for the bacterial bioluminescence reaction involving a dioxirane intermediate / F.M. Raushel, T.O. Baldwin // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1989. – Vol. 164. – №. 3. – P. 1137-1142.
107. Eckstein J. W. Mechanism of bacterial bioluminescence: 4a, 5-dihydroflavin analogs as models for luciferase hydroperoxide intermediates and the effect of substituents at the 8-position of flavin on luciferase kinetics / J.W. Eckstein, J.W. Hastings, S. Ghisla // *Biochemistry*. – 1993. – Vol. 32. – №. 2. – P. 404-411.
108. Cline T. W., Hastings J. W. Mutationally altered bacterial luciferase. Implications for subunit functions / T.W. Cline, J.W. Hastings // *Biochemistry*. – 1972. – Vol. 11. – №. 18. – P. 3359-3370.
109. Немцева Е.В. Механизм электронного возбуждения в биолуминесцентной реакции бактерий / Е.В. Немцева, Н.С. Кудряшева // *Успехи химии*. – 2007. – Т. 76. – №. 1. – С. 101-112.
110. Sukovataya I. E. Effect of microenvironmental changes on kinetic parameters of steady-state enzyme-induced bacterial bioluminescent reaction / I.E. Sukovataya, N.A. Tyulkova, E.V. Kaykova // *Bioluminescence and Chemiluminescence*. – 2007. – P. 27-30.
111. Sukovataya I. E. Kinetic analysis of bacterial bioluminescence in water–organic media / I.E. Sukovataya, N.A. Tyulkova // *Luminescence*. – 2001. – Vol. 16. – №. 4. – P. 271-273.
112. Kirillova T. N. Effect of heavy atoms in bioluminescent reactions / T.N. Kirillova, N.S. Kudryasheva // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2007. – Vol. 387. – P. 2009-2016.

113.Sukovataya I. E. The Modeling of viscous microenvironment for the coupled enzyme system of bioluminescence bacteria / I.E. Sukovataya, O.S. Sutormin, V.A. Kratasyuk // International Journal of Chemical and Molecular Engineering. – 2013. – Vol. 7. – №. 11. – P. 1070-1072.

114.Nemtseva E. V. Bacterial luciferases from *Vibrio harveyi* and *Photobacterium leiognathi* demonstrate different conformational stability as detected by time-resolved fluorescence spectroscopy / E.V. Nemtseva, D.V. Gulnov, M.A. Gerasimova, L.A. Sukovaty, L.P. Burakova, N.E. Karuzina, B.S. Melnik, V.A. Kratasyuk // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – №. 19. – C. 10449.

115.Tyulkova N. A. Bacterial bioluminescence and its application / N.A. Tyulkova, S.E. Medvedeva, E.K. Rodicheva, A.M. Kuznetsov // Bioluminescence in focus—a collection of illuminating essays. Research Signpost. Trivandrum, India. – 2009. – P. 27-49.

116.Lide, D.R. CRC handbook of chemistry and physics, internet version / D.R. Lide. - CRC Pres, 2005.

117.Telis V.R.N. Viscosity of aqueous carbohydrate solutions at different temperatures and concentrations / V.R.N. Telis, J. Telis-Romero, H. Mazzotti, A.L. Gabas // International Journal of food properties. – 2007. – Vol. 10. – №. 1. – P. 185-195.

118.Zhu C. Densities and viscosities of sugar alcohol aqueous solutions / C. Zhu, Y. Ma, C. Zhou // Journal of Chemical & Engineering Data. – 2010. – Vol. 55. – №. 9. – P. 3882-3885.

119.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.

120.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.

121.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.

122.Суковатый Л.А. Влияние осмолитов на биолюминесцентную 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.

123.Лисица А.Е. Вязкие среды замедляют распад ключевого интермедиата биолюминесцентной 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.

124. Simopoulos T. T. Alkaline phosphatase is an almost perfect enzyme / T.T. Simopoulos, W.P. Jencks // *Biochemistry*. – 1994. – Vol. 33. – №. 34. – P. 10375-10380.
125. Bergner T. Structural and biochemical properties of LuxF from *Photobacterium leiognathi* / T. Bergner, C.R. Tabib, A. Winkler, S. Stipsits, H. Kayer, J. Lee, J.P. Malthouse, S. Mayhew, F. Müller, K. Gruber, P. Macheroux // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. – 2015. – Vol. 1854. – №. 10. – P. 1466-1475.
126. 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.
127. Grote R. F. The stable states picture of chemical reactions. II. Rate constants for condensed and gas phase reaction models / R.F. Grote, J.T. Hynes // *The Journal of Chemical Physics*. – 1980. – Vol. 73. – №. 6. – P. 2715-2732.
128. Loveridge E. J. Solvent effects on environmentally coupled hydrogen tunnelling during catalysis by dihydrofolate reductase from *Thermotoga maritima* / E.J. Loveridge, R.M. Evans, R.K. Allemann // *Chemistry—A European Journal*. – 2008. – Vol. 14. – №. 34. – P. 10782-10788.
129. Coll R. J. Cryoenzymology of human plasmin catalysis: Comparison of cryosolvents and reactions with nitrophenyl ester and anilide substrates / R.J. Coll, A.L. Fink // *Cryobiology*. – 1987. – Vol. 24. – №. 4. – P. 332-344.
130. Masson P. Effects of viscosity and osmotic stress on the reaction of human butyrylcholinesterase with cresyl saligenin phosphate, a toxicant related to aerotoxic syndrome: Kinetic and molecular dynamics studies / P. Masson, S. Lushchekina, L.M. Schopfer, O. Lockridge // *Biochemical Journal*. – 2013. – Vol. 454. – №. 3. – P. 387-399.
131. Hou C. Understanding bacterial bioluminescence: a theoretical study of the entire process, from reduced flavin to light emission / C. Hou, Y. J. Liu, N. Ferré, W. H. Fang // *Chemistry—A European Journal*. – 2014. – Vol. 20. – №. 26. – P. 7979-7986.
132. Verma R. In Silico studies of small molecule interactions with enzymes reveal aspects of catalytic function / R. Verma, K. Mitchell-Koch // *Catalysts*. – 2017. – Vol. 7. – №. 7. – P. 212.
133. Lin M. H., Romsos D. R., Leveille G. A. Effect of glycerol on lipogenic enzyme activities and on fatty acid synthesis in the rat and chicken / M.H. Lin, D.R. Romsos, G.A. Leveille // *The Journal of nutrition*. – 1976. – Vol. 106. – №. 11. – P. 1668-1677.
134. Gogvadze, N.G. Conformational dynamics and solvent viscosity effects in carboxypeptidase-A-catalyzed benzoylglycylphenyllactate hydrolysis / N.G. Gogvadze, J.M. Hammerstad-pedersen, D.E. Khoshtariya, J. Ulstrup // *European journal of biochemistry*. – 1991. – Vol. 200. – №. 2. – P. 423-429.

- 135.Sampedro J. G. Trehalose-mediated inhibition of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis*: dependence on viscosity and temperature / J.G. Sampedro, R. A. Munoz-Clares, S. Uribe // *Journal of bacteriology*. – 2002. – Vol. 184. – №. 16. – P. 4384-4391.
- 136.Lushchekina S. V. Impact of sucrose as osmolyte on molecular dynamics of mouse acetylcholinesterase / S.V. Lushchekina, G. Inidjel, N. Martinez, P. Masson, M. Trovaslet-Leroy, F. Nachon, M.M. Koza, T. Seydel, J. Peters // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10. – №. 12. – P. 1664.
- 137.Lisitsa A.E. The role of cosolvent–water interactions in effects of the media on functionality of enzymes: a case study of bacterial luciferase / A.E. Lisitsa, L.A. Sukovatyi, A.A. Deeva, D.V. Gulnov, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk, E.V. Nemtseva // *Life – в печати*.
- 138.Cuecas A. Cellular viscosity in Prokaryotes and thermal stability of low molecular weight biomolecules / A. Cuecas, J. Cruces, J.F. Galisteo-López, X. Peng, J.M. Gonzalez // *Biophysical Journal*. – 2016. – Vol. 111. – №. 4. – P. 875-882.
- 139.Skóra T. Macromolecular crowding: how shape and interactions affect diffusion / T. Skora, F. Vaghefikia, J. Fitter, S. Kondrat // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2020. – Vol. 124. – №. 35. – P. 7537-7543
- 140.Raber M. L. Dissection of the stepwise mechanism to β -lactam formation and elucidation of a rate-determining conformational change in β -lactam synthetase / M.L. Raber, M.F. Freeman, C.A. Townsend // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol. 284. – №. 1. – P. 207-217.
- 141.Romero E. Same substrate, many reactions: oxygen activation in flavoenzymes / E. Romero, J.R. Gomez Castellanos, G. Gadda, M.W. Fraaije, A. Mattevi // *Chemical reviews*. – 2018. – Vol. 118. – №. 4. – P. 1742-1769.
- 142.Wenner J. R., Bloomfield V. A. Crowding effects on EcoRV kinetics and binding / J. R. Wenner // *Biophysical journal*. – 1999. – Vol. 77. – №. 6. – P. 3234-3241.
- 143.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.
- 144.Sierks M. R. Solvent and viscosity effects on the rate-limiting product release step of glucoamylase during maltose hydrolysis / M. R. Sierks, C. Sico, M. Zaw // *Biotechnology progress*. – 1997. – Vol. 13. – №. 5. – P. 601-608.
- 145.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.
- 146.Siddiqui K. S. Defying the activity–stability trade-off in enzymes: taking advantage of entropy to enhance activity and thermostability/ K. S. Siddiqui // *Critical reviews in biotechnology*. – 2017. – Vol. 37. – №. 3. – P. 309-322.

147. 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.
148. Burtseva O. The strains of bioluminescent bacteria isolated from the White Sea finfishes: genera *Photobacterium*, *Aliivibrio*, *Vibrio*, *Shewanella*, and first luminous *Kosakonia* / O. Burtseva, A. Kublanovskaya, O. Baulina, T. Fedorenko, E. Lobakova, K. Chekanov // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2020. – Vol. 208. – P. 111895.
149. Yancey P. H. Living with water stress: evolution of osmolyte systems / P.H. Yancey, M.E. Clark, S.C. Hand, R.D. Bowlus, G.N. Somero // Science. – 1982. – Vol. 217. – №. 4566. – P. 1214-1222.
150. Inlow J. K. Mutational analysis of the subunit interface of *Vibrio harveyi* bacterial luciferase / J. K. Inlow, T.O. Baldwin // Biochemistry. – 2002. – Vol. 41. – №. 12. – P. 3906-3915.
151. Noland B. Demonstration of two independently folding domains in the α subunit of bacterial luciferase by preferential ligand binding-induced stabilization / B.W. Noland, T.O. Baldwin // Biochemistry. – 2003. – Vol. 42. – №. 10. – P. 3105-3112.
152. Narayan A. Thermally versus chemically denatured protein states / A. Narayan, K. Bhattacharjee, A. N. Naganathan // Biochemistry. – 2019. – Vol. 58. – №. 21. – P. 2519-2523.
153. Dorn J. G. Effect of temperature, pH, and initial cell number on luxCDABE and nah gene expression during naphthalene and salicylate catabolism in the bioreporter organism *Pseudomonas putida* RB1353 / J.G. Dorn, R.J. Frye, R.M. Maier // Applied and environmental microbiology. – 2003. – Vol. 69. – №. 4. – P. 2209-2216.
154. Cui B. Engineering an enhanced, thermostable, monomeric bacterial luciferase gene as a reporter in plant protoplasts / B. Cui, L. Zhang, Y. Song, J. Wei, C. Li, T. Wang, Y. Wang, T. Zhao, X. Shen // PloS one. – 2014. – Vol. 9. – №. 10. – P. e107885.
155. Close D. The evolution of the bacterial luciferase gene cassette (lux) as a real-time bioreporter / D. Close, T. Xu, A. Smartt, A. Rogers, R. Crossley, S. Price, S. Ripp, G. Sayler // Sensors. – 2012. – Vol. 12. – №. 1. – P. 732-752.
156. Mackey B. M., Cross D., Park S. F. Thermostability of bacterial luciferase expressed in different microbes / B.M. Mackey, D. Cross, S.F. Park // Journal of applied bacteriology. – 1994. – Vol. 77. – №. 2. – P. 149-154.
157. Denisov I. Disposable luciferase-based microfluidic chip for rapid assay of water pollution / I. Denisov, K. Lukyanenko, A. Yakimov, I. Kukhtevich, E. Esimbekova, P. Belobrov, // Luminescence. – 2018. – Vol. 33. – №. 6. – P. 1054-1061.

- 158.Kolosova E. M. Bioluminescent-inhibition-based biosensor for full-profile soil contamination assessment / E. M. Kolosova, O. S. Sutormin, A.A. Shpedt, L.V. Stepanova, V.A. Kratasyuk // Biosensors. – 2022. – Vol. 12. – №. 5. – P. 353.
- 159.Kratasyuk V. A. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology / V.A. Kratasyuk, E.N. Esimbekova // Combinatorial chemistry & high throughput screening. – 2015. – Vol. 18. – №. 10. – P. 952-959.
- 160.Kurtasova L. M. Enzymatic status of blood lymphocytes in young children with Epstein-Barr virus infection / L.M. Kurtasova, A.E. Golovanova, A.A. Savchenko // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2010. – Vol. 149. – №. 3. – P. 337-341.
- 161.Zhukova G. V. Bioluminescent-triple-enzyme-based biosensor with lactate dehydrogenase for non-invasive training load monitoring / G.V. Zhukova, O.S. Sutormin, I.E. Sukovataya, N.V. Maznyak, V.A. Kratasyuk // Sensors. – 2023. – Vol. 23. – №. 5. – P. 2865.
- 162.Vetrova E. V. Characteristics of endogenous flavin fluorescence of *Photobacterium leiognathi* luciferase and *Vibrio fischeri* NAD(P)H:FMN-oxidoreductase / E.V. Vetrova, N.S. Kudryasheva, A.J.W.G. Visser, A. Van Hoek // Luminescence: The journal of biological and chemical luminescence. – 2005. – Vol. 20. – №. 3. – P. 205-209.
- 163.Экологическая биофизика: Научно-педагогическое издание: В 3 т. / Под общ. ред. И.И. Гительзона, Н.С. Печуркина. - М: Логос, 2002. Т. 1: Фотобиофизика экосистем. – 328 с.
- 164.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
- 165.Vasić V. Prevention and recovery of CuSO₄-induced inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase in rat brain synaptosomes by EDTA / V. Vasić, D. Jovanović, D. Krstić, G. Nikezić, A. Horvat, L. Vujisić, N. Nedeljković // Toxicology letters. – 1999. – Vol. 110. – №. 1-2. – P. 95-103.
- 166.Lencki R. W. Effect of ferric and cupric ions on the inactivation rate of dextransucrase / R.W. Lencki, M. Delaire, A. Tecante, L. Choplin // Applied microbiology and biotechnology. – 1994. – Vol. 42. – P. 263-269.
- 167.Sutormin O. S. Toxicity of different types of surfactants via cellular and enzymatic assay systems / O.S. Sutormin, E.M. Kolosova, I.G. Torgashina, V.A. Kratasyuk, N.S. Kudryasheva, J.S. Kinstler, D.I. Stom // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 24. – №. 1. – P. 515
- 168.Jeffers C. E., Tu S. C. Differential transfers of reduced flavin cofactor and product by bacterial flavin reductase to luciferase / C.E. Jeffers, S.C. Tu // Biochemistry. – 2001. – Vol. 40. – №. 6. – P. 1749-1754.

169.Sutormin O.S. Coupling of luciferase and NAD(P)H:FMN-oxidoreductase from luminous bacteria in viscous medium: finding weakest link in chain / O.S. Sutormin, E.V. Nemtseva, D.V. Gulnov, L.A. Sukovaty, Y.S. Tyrtysnaya, A.E. Lisitsa, V.A. Kratasyuk // Photochemistry and Photobiology, B: Biology. – *в печати*