

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Химический факультет

На правах рукописи

Веселов Максим Михайлович

Разработка магниточувствительных систем на основе агрегатов магнитных наночастиц с ферментами

1.5.6. Биотехнология

1.4.14. Кинетика и катализ

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

д.х.н., профессор Клячко Н.Л.

Москва - 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. СТИМУЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ УПРАВЛЕНИЯ АКТИВНОСТЬЮ ФЕРМЕНТОВ	10
1.1.1. МЕТОДЫ ОБРАТИМОГО КОНТРОЛЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА	13
1.1.1.1. ИЗМЕНЕНИЕ ДОСТУПНОСТИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ФЕРМЕНТА ДЛЯ СУБСТРАТА.....	13
1.1.1.2. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЛЕКУЛЕ ФЕРМЕНТА.....	19
1.1.1.3. МАГНИТОСТИМУЛИРУЕМЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ	27
1.1.2. МЕТОДЫ НЕОБРАТИМОГО КОНТРОЛЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ	29
1.1.2.1. АКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТА С ПОМОЩЬЮ ПОДХОДА КОНТРОЛИРУЕМОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ИЗ МАТРИЦЫ.....	29
1.1.2.2. АКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТА С ПОМОЩЬЮ ПРЕВРАЩЕНИЯ ПРОФЕРМЕНТА В АКТИВНЫЙ ФЕРМЕНТ	31
1.1.2.3. АКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТА С ПОМОЩЬЮ СКАЧКА pH, ИНДУЦИРОВАННОГО ЛАЗЕРОМ	32
1.1.2.4. ИНАКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТА С ПОМОЩЬЮ ИЗМЕНЕНИЯ ЛОКАЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ.....	32
1.1.2.5. ИНАКТИВАЦИЯ С ПОМОЩЬЮ ЛОКАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ	33
1.2. МАГНИТО-НАНОМЕХАНИЧЕСКИЙ ПОДХОД К УПРАВЛЕНИЮ СТРУКТУРОЙ И СВОЙСТВАМИ ФЕРМЕНТОВ	34
Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	40
2.1. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ	40
2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.2.1. СИНТЕЗ МНЧ	40
2.2.1.1. СИНТЕЗ МНЧ ТИПА ЯДРО ОБОЛОЧКА	40
2.2.1.1.1. СИНТЕЗ МАГНИТНЫХ ЯДЕР	40
2.2.1.1.2. ПОКРЫТИЕ МАГНИТНЫХ ЯДЕР ЗОЛОТОЙ ОБОЛОЧКОЙ	40
2.2.1.2. СИНТЕЗ МНЧ ТИПА ГАНТЕЛЬ (ГМНЧ)	41
2.2.2. ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ СИНТЕЗИРОВАННЫХ МНЧ	41
2.2.2.1. ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ МНЧ ТИПА ЯДРО-ОБОЛЧКА СЕРОСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ	41

2.2.2.2. ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ГМНЧ ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТОЙ (ГМНЧ-ЛК).....	41
2.2.2.3. СИНТЕЗ НИТРОДОФАМИНА	41
2.2.2.4. СИНТЕЗ КОНЪЮГАТА НИТРОДОФАМИН-ПЭГ	42
2.2.2.5. ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ГМНЧ КОНЪЮГАТОМ НИТРОДОФАМИН-ПЭГ (ПЭГ-ГМНЧ-ЛК)	42
2.2.3. СИНТЕЗ АГРЕГАТОВ МНЧ С БЕЛКАМИ	42
2.2.3.1. СИНТЕЗ АГРЕГАТОВ МНЧ С ХТ	42
2.2.3.2. СИНТЕЗ АГРЕГАТОВ МНЧ С АДГ	43
2.2.3.3. СИНТЕЗ АГРЕГАТОВ МНЧ-ИТ	43
2.2.3.4. СИНТЕЗ АГРЕГАТОВ ГМНЧ-ИББ	44
2.2.4. ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ СИНТЕЗИРОВАННЫХ МНЧ И АГРЕГАТОВ МНЧ С БЕЛКАМИ ..	44
2.2.4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГМНЧ [224]	44
2.2.4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП НА ПОВЕРХНОСТИ ПЭГ-ГМНЧ-ЛК.....	44
2.2.4.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРОВ И КОНЦЕНТРАЦИЙ МНЧ МЕТОДОМ NTA	45
2.2.4.4. ПЭМ.....	45
2.2.4.5. МЁССБАУЭРОВСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ	46
2.2.4.6. DLS	46
2.2.4.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ ХТ	46
2.2.5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЧПМП НА КИНЕТИКУ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ... 46	
2.2.5.1. ВЛИЯНИЕ НЧПМП НА КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ НАТИВНОГО ХТ И ХТ В АГРЕГАТАХ ТИПА МНЧ-ХТ-МНЧ	46
2.2.5.2. ВЛИЯНИЕ НЧПМП НА АКТИВНОСТЬ АДГ В СОСТАВЕ АГРЕГАТОВ С МНЧ	47
2.2.5.3. ВЛИЯНИЕ НЧПМП НА АКТИВНОСТЬ ХТ В СИСТЕМЕ МНЧ-ФЕРМЕНТ/МНЧ- ИНГИБИТОР	47
2.2.6. ИК-СПЕКТРОСКОПИЯ	48
2.2.6.1. РЕГИСТРАЦИЯ ИК-СПЕКТРОВ.....	48
2.2.6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ХТ.....	48
2.2.7. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ ХТ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАСТЯГИВАЮЩИХ СИЛ	48
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	50
3.1. СИНТЕЗ МНЧ СО СПОСОБНОСТЬЮ К БРАУНОВКОЙ РЕЛАКАЦИИ.....	50
3.1.1. СИНТЕЗ МНЧ МАГНЕТИТ-ЗОЛОТО ТИПА ЯДРО-ОБОЛОЧКА И ГАНТЕЛЬ.....	50
3.1.2. ИЗУЧЕНИЕ ФАЗОВОГО СОСТАВА СИНТЕЗИРОВАННЫХ МНЧ МЕТОДОМ МЁССБАУЭРОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ.....	52

3.1.3. ВЫЧИСЛЕНИЕ КРИТИЧЕСКОГО РАДИУСА, ОПРЕДЕЛЯЮЩЕГО МЕХАНИЗМ РЕЛАКСАЦИИ МНЧ МАГНЕТИТА И МАГГЕМИТА.....	53
3.2. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА МНЧ МАГНЕТИТ-ЗОЛОТО, В РЕЗУЛЬТАТЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИХ СТРУКТУРЫ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НЧПМП.....	55
3.2.1. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ИНАКТИВАЦИИ ХТ В АГРЕГАТЕ ТИПА МНЧ-ХТ-МНЧ («ДИМЕР») ПОД ДЕЙСТВИЕМ НЧПМП	56
3.2.1.1. ПОЛУЧЕНИЕ АГРЕГАТОВ ТИПА МНЧ-ХТ-МНЧ С РАЗЛИЧНОЙ МОДИФИКАЦИЕЙ ГРУПП ФЕРМЕНТА.....	56
3.2.1.2. ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ВО ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЕ ХТ В АГРЕГАТЕ ТИПА МНЧ-ХТ-МНЧ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НЧПМП.....	59
3.2.1.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ ХТ	61
3.2.1.4. ВЛИЯНИЕ НЧПМП НА КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ХТ В СОСТАВЕ АГРЕГАТОВ ТИПА МНЧ-ХТ-МНЧ.....	62
3.2.1.5. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ ХТ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ РАСТЯГИВАЮЩИХ СИЛ	66
3.2.2. ИНАКТИВАЦИЯ АДГ В АГРЕГАТАХ ТИПА МНЧ-ФЕРМЕНТ-МНЧ («ДИМЕР») ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НЧПМП.....	73
3.2.2.1. ПОЛУЧЕНИЕ АГРЕГАТОВ ТИПА МНЧ-АДГ-МНЧ	73
3.2.2.2. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЧПМП НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ АДГ В СОСТАВЕ АГРЕГАТОВ ТИПА МНЧ-ФЕРМЕНТ-МНЧ	75
3.3. УПРАВЛЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ ФЕРМЕНТ-ИНГИБИТОР В АГРЕГАТАХ МНЧ-ФЕРМЕНТ И МНЧ-ИНГИБИТОР С ПОМОЩЬЮ НЧПМП.....	80
3.3.1. ПОЛУЧЕНИЕ «ДИМЕРНЫХ» АГРЕГАТОВ МНЧ-ФЕРМЕНТ-ИНГИБИТОР-МНЧ ЗА СЧЕТ СВЯЗЫВАНИЯ «МОНОМЕРНЫХ» АГРЕГАТОВ МНЧ-ФЕРМЕНТ И МНЧ-ИНГИБИТОР	80
3.3.2. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЧПМП НА ВОЗМОЖНОСТЬ РАЗРУШЕНИЯ КОМПЛЕКСА ФЕРМЕНТ-ИНГИБИТОР В СОСТАВЕ АГРЕГАТА МНЧ-ФЕРМЕНТ-ИНГИБИТОР-МНЧ	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ	96
БЛАГОДАРНОСТИ	97
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	120

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

DLS – динамическое светорассеяние, dynamic light scattering
EDC – N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид гидрохлорид
mPEG-NHS – метоксиполиэтиленгликоль-N-гидроксисукцинимид
NSAAPFrNA – N-сукцинил-аланил-аланил-пролил-фенилаланил-паранитроанилид
NTA – анализ траектории наночастиц, nanoparticles tracking analysis
PDAM – 1-пиринилдиазометан
S-NHS – N-гидроксисульфосукцинимид натриевая соль
АДГ – алкогольдегидрогеназа
АФК – активные формы кислорода
ВЧПМП – высокочастотное переменное магнитное поле
ГМНЧ – гантелевидные МНЧ
ДМФА – диметилформаид
ИББ – ингибитор Бауман-Бирка
ИК – инфрокрасный
ИТ – ингибитор трипсина
ММ – макромолекула
МНМ – магнито-наномеханический
МНЧ – магнитные наночастицы
МП – магнитное поле
НАД⁺ - никотинамидадениндинуклеотид
НЧ – наночастицы
НЧПМП – низкочастотное переменное магнитное поле
ПНФТМА – паранитрофениловый эфир триметилуксусной кислоты
ПЭГ – полиэтиленгликоль
ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
ТРИС – трис(гидроксиметил)аминометан
ФАД – флавинадениндинуклеотид
ХТ – α -химотрипсин
ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Ферменты — это уникальные белковые «машины», отвечающие за ускорение (катализ) реакций в разнообразных биопроцессах во всех живых клетках. Известно, что ферменты являются одними из самых эффективных катализаторов, ускоряющих химические реакции на величину до 17 порядков. Столь громадное ускорение, в основном, объясняется пространственной структурой белковой глобулы и взаимным расположением функциональных групп в активном центре фермента. Взаимосвязь структуры и функции ферментов является предметом широкого обсуждения, затрагивающего такие области, как биотехнология, медицина и различные направления химии. Одним из способов изучения такой взаимосвязи является магнитонаномеханический (МНМ) подход, основой которого является изменение конформации и активности иммобилизованного фермента в ответ на механическое воздействие со стороны магнитных наночастиц (МНЧ), совершающих вращательно-колебательные движения во внешнем низкочастотном переменном магнитном поле (НЧПМП). Кроме фундаментальных исследований взаимосвязи структура-функция, МНМ подход позволяет создавать биокаталитические системы, способные удаленно реагировать на внешние физические воздействия. Такие системы могут быть востребованы при разработке промышленных процессов, построенных на ферментативных каскадных реакциях.

Степень разработанности темы исследования. В литературе описана теоретическая модель влияния НЧПМП на активность ферментов, иммобилизованных на МНЧ. Кроме того, в экспериментах с ферментами, иммобилизованными на МНЧ магнетит-золото типа ядро-оболочка, было показано снижение активности в результате воздействия НЧПМП. Однако, в этих работах внимание авторов не было сосредоточено на молекулярных механизмах подобной инактивации ферментов.

Цели и задачи работы. Целью данной работы стала разработка и оптимизация магниточувствительных систем, способных воздействовать на конформацию и активность ряда ферментов, иммобилизованных на МНЧ, а также изучение молекулярных механизмов наблюдаемых эффектов. Для достижения заявленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Синтез, функционализация поверхности и характеристика МНЧ магнетит-золото типа ядро-оболочка и типа гантель, обладающих способностью релаксировать по Брауновскому механизму в НЧПМП
2. Синтез агрегатов МНЧ с ферментами «димерного» и «мономерного» строения
3. Изучение влияния НЧПМП на структуру и активность химотрипсина (ХТ) в составе агрегатов различного строения в зависимости от природы модифицируемого аминокислотного остатка фермента и/или наличия ингибитора в системе.

4. Проведение компьютерного моделирования поведения ХТ под действием растягивающих сил методом управляемой молекулярной динамики.

5. Изучение влияния НЧППП на активность алкогольдегидрогеназы (АДГ) из дрожжей в составе агрегатов с частицами типа МНЧ-фермент-МНЧ.

Научная новизна. Впервые экспериментально был выявлен молекулярный механизм инактивации агрегатов ХТ с МНЧ состава МНЧ-фермент-МНЧ под воздействием НЧППП. Доказана МНМ природа воздействия НЧППП на ХТ в составе такого агрегата.

Впервые были получены и охарактеризованы агрегаты АДГ с МНЧ состава МНЧ-фермент-МНЧ. Показана возможность регуляции фермента, не относящегося к классу гидролаз.

Впервые показано, что в агрегате МНЧ-фермент-ингибитор-МНЧ воздействие НЧППП может разрушить взаимодействие фермент-ингибитор, восстанавливая при этом активность фермента. Обнаружено, что, в зависимости от природы ингибитора (и константы ингибирования), силы, возникающие при вращательно-колебательных движениях МНЧ в НЧППП, могут оказаться недостаточными для разрыва взаимодействия.

На основе экспериментальных данных, полученных в данной работе, впервые предложены общие рекомендации для выбора условий взаимодействия фермента с МНЧ, позволяющие достичь наибольшего влияния НЧППП на ферментативную активность.

Теоретическая и практическая значимость работы. Показана возможность удаленно регулировать активность ферментов, входящих в состав агрегатов с МНЧ, с помощью НЧППП. Такие агрегаты являются перспективными материалами для использования при разработке ферментативных каскадов. Описанные тенденции влияния НЧППП на ферменты в зависимости от условий реакции конъюгации позволяют теоретически обосновать условия и дать практические рекомендации к созданию подобных систем. Кроме того, полученные результаты влияния НЧППП на систему состава МНЧ-фермент-МНЧ могут быть основой для фундаментального изучения и обоснования механизма действия ферментов в условиях механического стимула.

Положения, выносимые на защиту.

1. Синтезированные МНЧ типа ядро-оболочка или гантель претерпевают Брауновский механизм релаксации в НЧППП, возможность протекания которого определяется размером и фазовым составом МНЧ.

2. Воздействие НЧППП приводит к изменениям во вторичной структуре ХТ в составе агрегатов МНЧ-ХТ-МНЧ с модифицированными амино- или карбоксильными группами фермента. Снижение активности фермента под воздействием НЧППП является следствием ухудшения способности фермента связывать субстрат. Все изменения носят обратимый

характер. Влияние НЧППП на центр связывания субстрата подтверждается результатами компьютерного моделирования поведения ХТ под действием растягивающих сил.

3. Воздействие НЧППП на АДГ в составе агрегата типа МНЧ-фермент-МНЧ также приводит к снижению активности фермента. На основании экспериментальных данных сформулированы общие рекомендации по выбору условий иммобилизации белков на МНЧ для максимизации влияния НЧППП на активность ферментов.

4. Природа ингибитора оказывает влияние на возможность управления активностью фермента под действием НЧППП. Для пары ХТ-ингибитор трипсина (ИТ) наблюдается разрушение комплекса и частичное восстановление активности. Для пары ХТ-ингибитор Баумана-Бирк (ИББ) действие НЧППП приводит к агрегации и потере активности фермента.

Методология исследования и методы исследования. В рамках данной работы были использованы следующие методы и подходы: методы синтеза наноматериалов (соосаждение, высокотемпературное разложение в инертной атмосфере), современные методы характеристики материалов (Nanoparticles Tracking Analysis (NTA), Dynamic Light Scattering (DLS)), просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), Мессбауэровская спектроскопия, ¹H-ЯМР-спектроскопия, спектрофотометрия, ИК-спектроскопия), методы иммобилизации ферментов (использование сшивающих агентов) и другие методы создания и исследования свойств биокатализаторов, кинетические методы анализа, компьютерное моделирование.

Личный вклад автора. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований. Автор самостоятельно изучил современные литературные данные по теме исследования и составил обзор литературы. Автор самостоятельно или при непосредственном участии выполнил все эксперименты, собрал, обработал и проанализировал полученные результаты, принимал участие в написании всех статей. В работах, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит автору. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль автора была определяющей.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов определяется использованием большого количества современных методов исследования и выполнением экспериментов на высокоточном оборудовании с обработкой результатов статистическими методами. Результаты исследования обсуждались на семинарах лаборатории, публиковались в рецензируемых зарубежных и отечественных изданиях и докладывались на российских и международных конференциях, в том числе: 12th International Conference “Biocatalysis: Fundamentals and Applications”, Санкт Петербург, Россия, 2019 (устный доклад), International Congress Biotechnology: State of the art and perspectives., Москва, Россия, 2019 (устный доклад), International forum Biotechnology: state

of the art and perspectives. Russia, 2018.(стендовый доклад), 12-th International Conference on the Scientific and Clinical Application of Magnetic Carriers, Дания, 2018 (стендовый доклад), II Международная научно-практическая школа-конференция "Магнитные наноматериалы в биомедицине: получение, свойства, применение", Россия, ноябрь 2017 (стендовый доклад), International Conference on Nanomedicine and Nanobiotechnology 2017 (ICONAN2017), Испания, 2017 (стендовый доклад), Biocatalysis-2017: Fundamentals & applications., Россия 2017, (стендовый доклад), 8th International conference "Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues", Греция, 2017 (устный доклад), , 6th International Conference "Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety - Toxicology and Ecology Issues", Греция, 2015 (устный доклад), 5th International Congress "Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety - Toxicology and Ecology Issues", Греция, 2014 (устный доклад), International Scientific Conference "Science of the future", Россия, 2014 (стендовый доклад). Доклад автора на седьмой международной конференции "Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues" (2016) был признан лучшим стендовым докладом.

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 11 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых базами Web of Science и Scopus, 1 статья в сборнике и 11 тезисов докладов всероссийских и международных конференций.

Связь работы с государственными программами. Работа выполнена при поддержке МГУ имени М.В. Ломоносова (тема госрегистрации 121041500039-8). Часть результатов получена в рамках грантов РНФ (22-13-00261 и 14-13-00731).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы (260 ссылок) и Приложения. Работа изложена на 124 страницах машинописного текста, содержит 46 рисунков и 10 таблиц.

1.1. СТИМУЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ УПРАВЛЕНИЯ АКТИВНОСТЬЮ ФЕРМЕНТОВ

Глобальные тренды на создание более устойчивых процессов и получение целевых продуктов с использованием биотехнологических путей их синтеза внесли вклад в применение ферментов в промышленности [1]. Промышленные процессы, построенные на высокоактивных, селективных и специфических ферментативных реакциях в совокупности с тем, что ферменты сами по себе являются биodeградируемыми и возобновляемыми ресурсами, полностью удовлетворяют принципам «зеленой химии» [2]. Принципы биокатализа позволяют снизить количество стадий синтеза, избавиться от токсичных реагентов и жестких условий проведения реакций, позволяют снизить количество побочных продуктов и отходов а также достигать больших выходов реакций с высокой степенью хемо-, регио- и стереоселективности [2]. Более того, применение нескольких ферментов в едином каскаде, протекающем в одном и том же реакционном сосуде, обеспечивает еще большую экономическую эффективность и уменьшение отходов в результате снижения количества стадий очистки и выделения продуктов реакций, что делает такие процессы еще более привлекательными [3]. Однако, в последние годы в научной литературе появились данные о том, что проблема перекрестной реакционной способности ферментов может помешать широкому внедрению таких процессов в промышленность [4, 5]. Перекрестная реакционная активность ферментов означает, что один из ферментов каскада может катализировать превращение не только своего целевого субстрата, но и субстраты/интермедиаты/продукты других ферментативных реакций в каскаде. При этом данная проблема становится особенно актуальной для сложных многоферментных каскадов [5]. Примером перекрестной реакционной способности может служить двухстадийный процесс дерацемизации α -хиральных первичных аминов, которые происходит в результате последовательных реакций энантиоселективного дезаминирования и стереоселективного аминирования, катализируемых двумя трансаминазами [6] (Рисунок 1). Перекрестная реакционная способность трансаминаз при этом приводит к снижению оптической чистоты конечного продукта. В данном случае проблема может быть решена с помощью температурной инактивации трансаминазы, катализирующей первую стадию процесса перед тем, как в систему будет добавлен второй фермент. В качестве альтернативного подхода решения проблемы перекрестной реакционной способности было предложено использовать иммобилизованные трансаминазы [7], когда первая трансаминаза удаляется из реакционной среды по окончании первой стадии процесса.

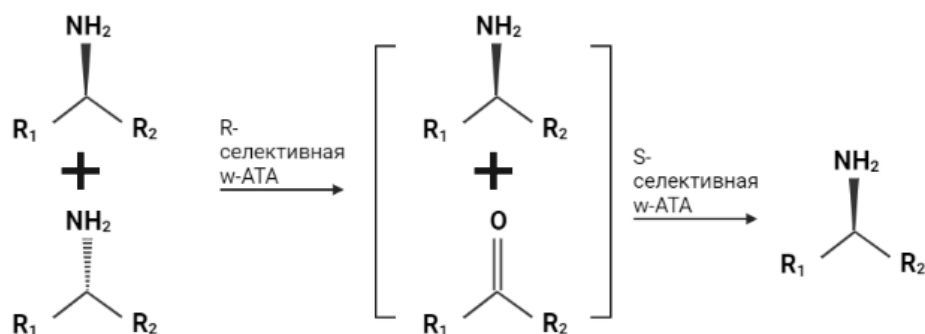


Рисунок 1. Схема каскадного процесса дерацемизации α -хиральных первичных аминов под действием двух *w*-трансаминаз (*w*-АТА).

Другим примером перекрестной реакционной способности в ферментативных каскадах является двухстадийный процесс синтеза нор(псевдо)эфедрина [8] (Рисунок 2). На его первой стадии происходит декарбоксилирование пирувата с одновременным связыванием бензальдегида под действием тиаминдифосфат зависимой ацетолактатсинтазы. (R)-фенилацетилкарбинол, образовавшийся на первой стадии, превращается в конечный продукт под действием (R)- или (S)- селективной трансаминазы. Проблема данного процесса заключается в том, что бензальдегид также является субстратом трансаминазы.

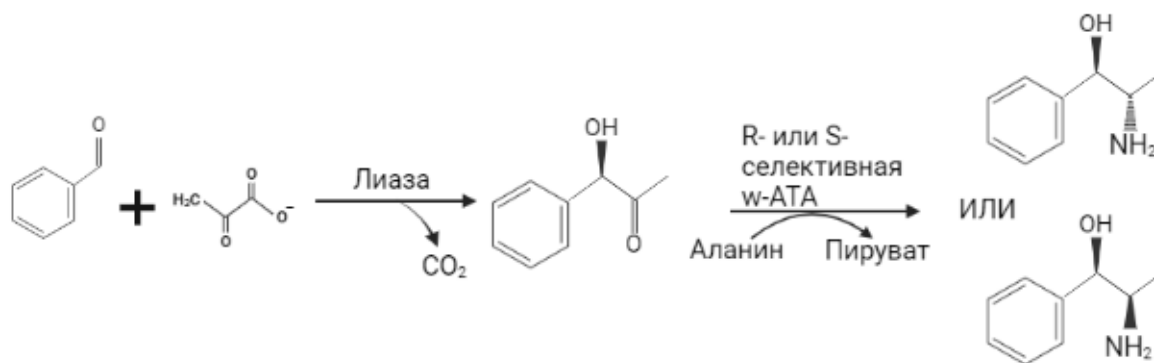


Рисунок 2. Схема двухстадийного синтеза нор(псевдо)эфедрина.

Кроме проблемы перекрестной реакционной способности в ферментативных каскадных реакциях существует возможность того, что субстраты/интермедиаты/продукты одной из стадий будут являться ингибиторами фермента в другой стадии. Так, двухстадийный процессе получения хиральных эпоксидов включает восстановление прохиральных α -хлоркетонов под действием алкогольдегидрогеназы и последующее дегалогенирование под действием галогидрин дегалогеназы с замыканием цикла интермедеата хлоргидрина [9] (Рисунок 3). В

данном процессе наблюдалось ингибирование галогидрин дегалогеназы в случае некоторых α -хлоркетонов.

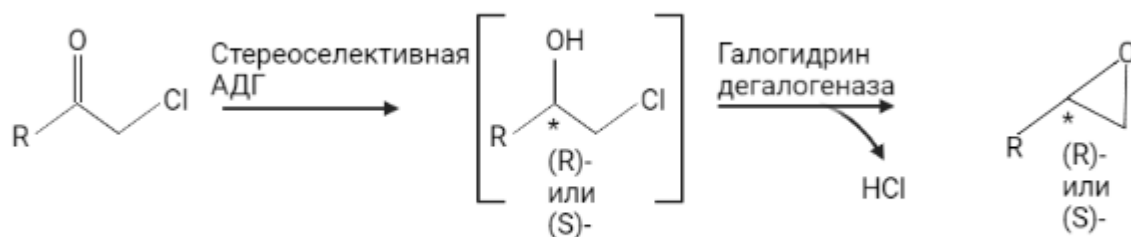


Рисунок 3. Схема каскадного процесса получения энантиомерно чистых эпоксидов.

Решением проблем перекрестной реакционной способности ферментов и их ингибирования продуктами других стадий может стать включение стадии удаления катализатора после каждой ферментативной стадии [10] или их пространственно-временное разделение [7]. Однако такие подходы приводят к тому, что практически все преимущества использования каскадных процессов нивелируются. Кроме того, данные подходы практически невозможно осуществить, если речь идет о сложных многостадийных процессах. Существует альтернативный способ решения данных проблем, основанный на динамической регуляции активности ферментов, так называемое контролируемое включение/выключение (вкл./выкл.) Так, удаленно «переключая» фермент из активного в неактивное состояние и обратно в ходе каскадного ферментативного процесса, проходящего в одном реакционном сосуде, можно предотвратить неспецифическое связывание субстрата. При этом фермент, будучи активен только в течение заданного временного интервала, будет катализировать только превращение своего целевого субстрата, что предотвратит перекрестную ферментативную активность. Предполагается, что в идеальном ферментативном каскадном процессе, каждая из его стадий активируется своим собственным внешним воздействием в строго заданном временном промежутке [5]. Таким образом, для успешного внедрения таких процессов в промышленность в первую очередь необходимо разработать целый набор методов удаленного контроля вкл./выкл. активности ферментов. В данной главе будут рассмотрены основные методы такого контроля, а также будут показаны их достоинства и недостатки.

Для достижения контроля вкл./выкл. ферментов могут быть применены различные типы воздействия, такие как внутренние (эндогенные), так и внешние (экзогенные). Подходящие воздействия должны позволять контролировать реакции удаленно, а оператор должен иметь возможность четко их регулировать во времени. Методы удаленного контроля активности

ферментов могут быть обратимыми и необратимыми. Обратимые методы подразумевают, что вкл./выкл. активности фермента может быть осуществлено многократно, в то время как необратимые методы позволяют это сделать только однократно.

1.1.1. МЕТОДЫ ОБРАТИМОГО КОНТРОЛЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА

1.1.1.1. ИЗМЕНЕНИЕ ДОСТУПНОСТИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ФЕРМЕНТА ДЛЯ СУБСТРАТА

а. *Блокирование активного центра.*

К настоящему времени для водорастворимых ферментов существует два различных подхода к блокировке активного центра: с помощью стимул-чувствительного ковалентно-или нековантно связанного эффектора. В первом случае молекула эффектора (обычно ингибитора) изменяет свою конформацию в ответ на воздействие стимула, при этом ее связывание в активном центре возможно только в одной из конформаций (Рисунок 4 А). Так, была показана возможность обратимого контроля вкл./выкл активности тромбина с помощью светочувствительной цис-транс изомеризации молекулы азобензола, которая взаимодействовала с ДНК-теломеразным ингибитором тромбина [11].

Крайне интересным примером систем, обладающих способностью обратимого контроля вкл./выкл. ферментативной активности в результате цис-транс изомеризации молекулы ингибитора, являются работы [12, 13]. В них было показано, что специально синтезированные ингибиторы ХТ и трипсина переходили из транс- в цис-форму при длинах волн 365 и 390 нм, соответственно. При этом при облучении светом с длиной волны 460 нм данные фотоингибиторы возвращались в термодинамически более стабильную транс-форму. В обоих случаях транс-форма ингибитора была более сильным ингибитором по сравнению с цис-формой. При облучении химотрипсина, связанного с фотоингибитором, УФ-излучением с длиной волны 365 нм происходила изомеризация ингибитора, в результате чего константа ингибирования повышалась, и ферментативная активность резко увеличивалась. При облучении такой смеси светом с длиной волны 460 нм происходил процесс обратной изомеризации ингибитора, константа ингибирования снижалась и ферментативная реакция останавливалась. Изменяя динамические характеристики УФ- и видимого света, авторам удалось создать систему на основе ХТ и фоточувствительного ингибитора, обладающую свойствами сверхчувствительности, а именно изменение активности фермента в ответ на стимулы с определенными характеристиками [12]. В данном случае сверхчувствительность наблюдалась при длительности УФ- облучения более трех минут, за которыми следовали короткие периоды облучения видимым светом в течение 15 секунд [12]. Дополнив систему ХТ-

фоточувствительный ингибитор аналогичной системой, содержащей трипсин-фоточувствительный ингибитор удалось достигнуть контроля вкл./выкл. активности в биферментной системе [13].

Поскольку ингибитор обычно специфичен по отношению только к одному ферменту или узкому классу, новые пары фермент-ингибитор, подходящие для данного метода, необходимо подбирать заново. Хотя этот процесс довольно трудоемок, он достижим, о чем свидетельствует разнообразие ферментов, для которых данный подход был применен [14-25]. Стоит отметить, что при промышленном использовании такого метода необходимо учитывать разделение больших количеств ингибитора и продукта по окончании реакции.

В случае, когда стимул-чувствительный эффектор ковалентно связан с молекулой фермента, изменение его конформации под воздействием внешнего стимула приводит к блокированию или деблокированию активного центра для доступа субстрата (Рисунок 4 Б). Так, активность мутанта эндоглюканазы 12А, модифицированной полимерами, содержащими термо- [26] или фоточувствительные [27] остатки, удаленно регулировалась в процессе гидролиза целлюлозы. В зависимости от размера субстрата и длины полимерной цепи достигалось почти полное, но обратимое выключение активности фермента. Аналогичные результаты были получены для мутанта гепариназы III [28].

Успешная реализация данного подхода для различных ферментов требует подробных знаний о трехмерной структуре фермента и его активного центра, а также сайт-специфичной модификации аминокислотных остатков вблизи активного центра с помощью молекул, которые могут закрывать вход в сайт связывания под действием внешнего стимула. Таким образом, размер и расположение связанного остатка имеют решающее значение для успешного контроля активности фермента с помощью метода, описанного выше. Хотя задачи подбора подходящих условий являются весьма трудоемкими, описанный подход может быть универсальным, присущим большинству ферментов.

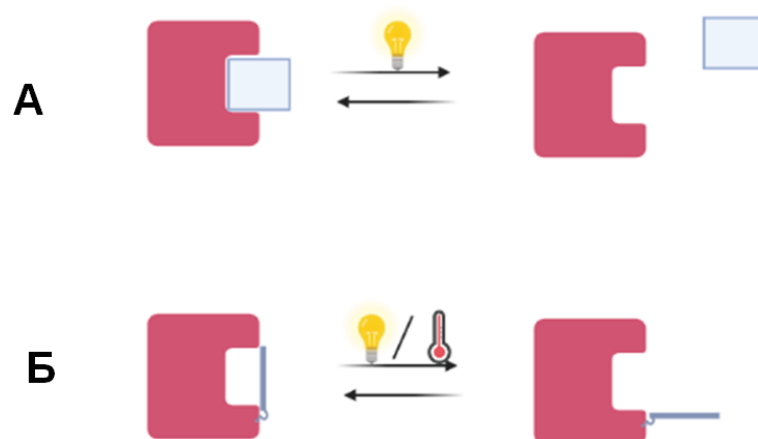


Рисунок 4. Схема обратимого блокирование активного центра фермента с помощью эффектора, который (А) нековалентно или (Б) ковалентно связан с ферментом.

Примеры изменения доступности активного центра для субстрата описаны в работах [29, 30]. Было показано, что суперпарамагнитных НЧ, содержащие иммобилизованные α -амилазу, липазу или хитиназу на своей поверхности, образовывали агрегаты под действием постоянного МП. Такая агрегация скрывала часть активных центров, которые становились недоступными для субстрата, в результате чего активность была крайне низкой. Воздействие на агрегаты вращающегося МП приводило к изменению активности иммобилизованных ферментов в зависимости от частоты вращающегося МП. Так, активность ферментов увеличивалась при частоте МП менее 5 Гц, а при более высоких частотах возвращалась к исходным значениям. Авторы предполагают, что вращающееся МП вращало агрегаты, в результате чего их размер становился меньше, а иммобилизованный фермент становился более доступным для субстрата. Однако при частоте МП более 5 Гц агрегаты не успевали вращаться вслед за изменением вектора магнитной индукции, и процесс дезагрегации прекращался (Рисунок 5).

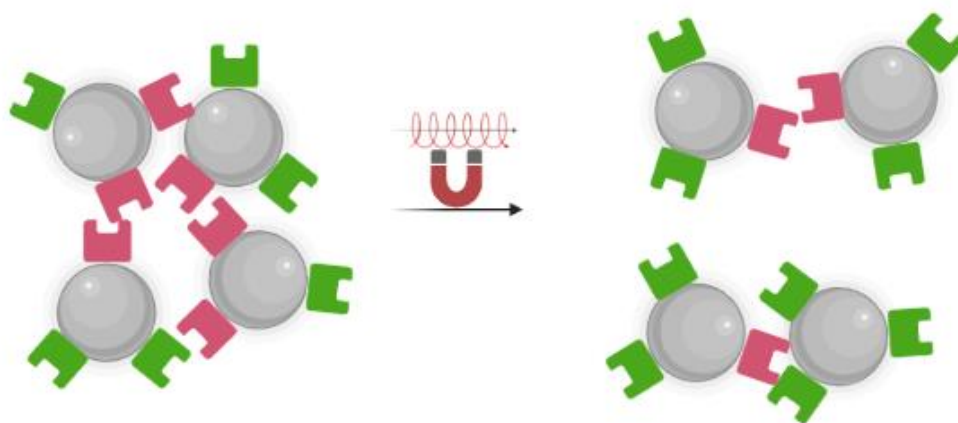


Рисунок 5. Схема изменения доступности для субстрата активного центра фермента, иммобилизованного на МНЧ, под действием вращающегося МП. В агрегате часть молекул фермента (красные) окружена МНЧ, что снижает доступность активного центра для субстрата и активность. Агрегаты вращаются под действием МП, распаваясь на более мелкие, доступность фермента для субстрата повышается.

б. *Образование реакционных «нанокompартментов».*

Изменение доступности активного центра фермента также может быть достигнуто благодаря образованию реакционных «нанокompартментов». Для этого фермент и его субстрат отдельно должны быть иммобилизованы на суперпарамагнитных НЧ, способных агрегировать под действием МП [31]. В отсутствие МП фермент и субстрат, будучи иммобилизованными на различных МНЧ, не контактируют друг с другом, поскольку полимерная шуба МНЧ препятствует этому. При этом ферментативная активность не наблюдается. МП вызывает агрегацию МНЧ, в результате чего снимается пространственная разделенность фермента и субстрата и наблюдается активация ферментативной реакции. (Рисунок 6 А). Данный процесс может быть обратимым, если при выключении МП агрегаты МНЧ будут распадаются.

Другой пример описания варианта контроля с помощью образования реакционных «нанокompартментов» является работа, в которой использовали два типа МНЧ: модифицированные (1) «целевым» ферментом (глюкоамилаза) и (2) «стимулирующим» ферментом (уреаза или трипсин). Поверхность МНЧ была покрыта заряженным полимером, который препятствовал агрегации наночастиц в растворе. Одним из продуктов реакции, катализируемой стимулирующим ферментом, был OH^- или H^+ , однако правильно подобранная буферная емкость раствора не позволяла изменить рН раствора. Воздействие МП приводило к агрегации МНЧ, содержащих целевой и стимулируемый

фермент, в результате чего наблюдалось локальное изменение рН в области агрегатов, которое приводило к изменению активности целевого фермента [32, 33].

В литературе представлен пример иного подхода к созданию реакционных «нанокompартментов». Так, пероксидаза хрена была инкапсулирована в фоточувствительных полимеросомах, мембрана которых была сконструирована так, чтобы ее проницаемость изменялась при изомеризации фоточувствительной молекулы (спиропиран) под действием видимого света [34]. Селективность контроля вкл./выкл. ферментативной активности достигалась за счет того, что мембрана полимеросом была проницаема для субстрата только в одной из конформаций спиропирана (Рисунок 6 Б).

Формирование реакционных «нанокompартментов» может быть общим подходом для множества ферментов. Однако, были выражены опасения, что для промышленного биокатализа данный подход может оказаться не применимым, так как образование реакционных «нанокompартментов» и стремление к достижению высоких концентраций продукта исключают друг друга.

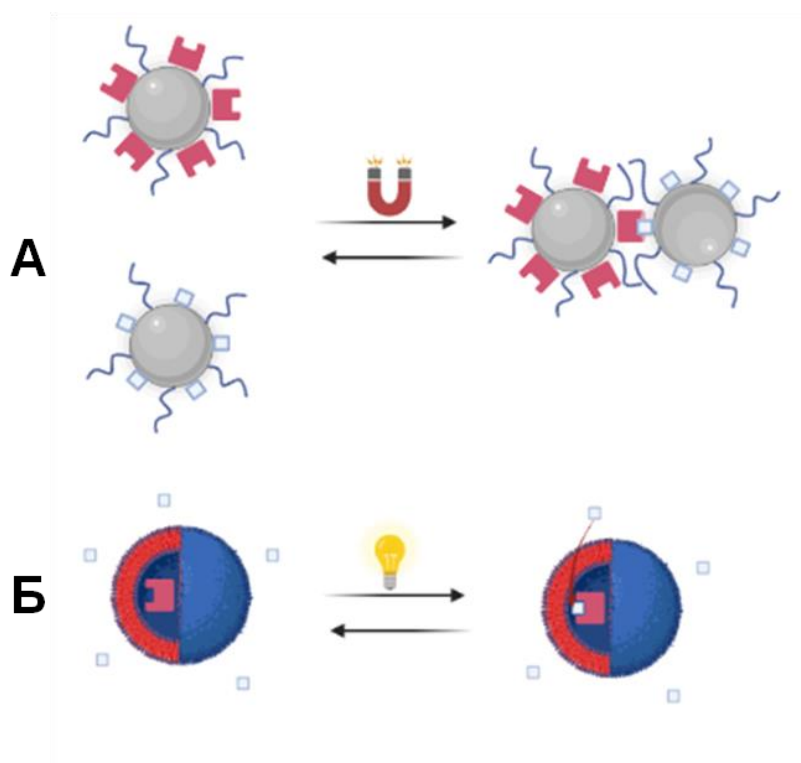


Рисунок 6. Схема обратимого образование реакционных «нанокompартментов» (А) В результате воздействия МП происходит агрегация МНЧ, содержащих иммобилизованные фермент или его субстрат, приводящая к активации ферментативной реакции. (Б) Воздействие видимого света приводит к изменению проницаемости для субстрата мембраны полимеросомы, содержащей иммобилизованный фермент.

в. *Увеличение скорости массопереноса.*

В большинстве случаев промышленное применение ферментов подразумевает, что они используются в виде иммобилизованных препаратов. Иммобилизация позволяет повысить стабильность фермента [35], а также облегчить очистку конечного продукта и повторное использование ферментного препарата [36]. Однако иммобилизация также может снизить эффективность ферментативного катализа в результате снижения скорости массопереноса субстрата из объема раствора к границе раздела фаз [37]. В литературе был предложен метод преодоления данного ограничения с помощью ультразвуковых акустических колебаний, вызывающих увеличение скорости массопереноса реагентов из объема к активному центру иммобилизованного фермента [38]. В реакционной смеси механическое воздействие ультразвука интенсифицирует массоперенос, что приводит к снижению диффузионных затруднений [39]. Так, с помощью ультразвука была увеличена активность тирозиназы [40], глюкоамилазы [41, 42], липазы [43, 44], целлюлазы [45, 46] коммерческого ферментного препарата Lypozyme 435 [47, 48], ксиланазы [49], а также процесс энзимолита картофельного белка [50]. Ограничением данного подхода является то, что для каждого фермента необходимо подбирать свои оптимальные условия ультразвукового воздействия (мощность, время воздействия) для ускорения ферментативной реакции [48]. При этом необходимо учитывать, что длительное воздействие ультразвука высокой мощности может привести к инактивации фермента [51]. Хотя большинство авторов подобных работ указывает на то, что под действием ультразвука ускоряется массоперенос субстрата к активному центру фермента, некоторыми авторами высказываются предположения, что ультразвук может вызывать конформационные изменения в молекуле фермента [52].

Другим способом повысить скорость массопереноса реагентов из объема раствора к границе раздела фаз, где расположен фермент, является использование перемешивания, которое может обеспечить низкочастотное МП. Так, вращающееся МП приводит к тому, что МНЧ, содержащие иммобилизованный фермент на своей поверхности, совершают вращательно-колебательные движения. При этом МНЧ выступают в качестве «наноразмерного перемешивателя», способствующего массопереносу и ускоряющего химическую реакцию. Так, было показано [53], что скорость реакции, катализируемой лакказой, иммобилизованной на МНЧ, увеличивается более чем в два раза по сравнению с контрольным экспериментом, в котором образец не подвергали воздействию МП. В то же время, скорость реакции под действием МП была сопоставима со скоростью реакции, которую проводили в отсутствие МП, но при перемешивании реакционной смеси. В другом примере было показано, что под действием МП (50-600 Гц) сшитые агрегаты липазы, модифицированные МНЧ, действуют как «микроскопическая мешалка», в

результате чего увеличивается скорость образования (R,S)-2-октанола [54]. Выводы данных работ является достаточно дискуссионным, поскольку не было четко показан механизм активации ферментативной реакции.

1.1.1.2. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЛЕКУЛЕ ФЕРМЕНТА

а. *Связывание с фоточувствительными молекулами и матрицами.*

Для вызова фоточувствительных конформационных изменений ферментов и белков существует два подхода: (1) специфическая [55-58] или неспецифическая [59-65] модификация фоточувствительными молекулами или (2) включение в фоточувствительные матрицы [66, 67]. В первом случае изомеризация фоточувствительных фрагментов, включенных в область белковой молекулы, важной для поддержания трехмерной структуры его активного центра, приводит к изменению конформации фермента (Рисунок 7 А). При этом в результате таких изменений ухудшается либо связывание субстрата с ферментом, либо снижается эффективность каталитической стадии процесса [55-57, 59, 60, 63-67]. Так, активность мутанта кинезин АТФазы, в которой остатки цистеина сайта связывания микротрубочек были модифицированы фоточувствительными фрагментами, например, производными азобензола, снижалась в два раза в результате светоиндуцированной изомеризации азобензола [58]. Активность мутанта рестрикционной эндонуклеазы RvuII, модифицированной бифункциональными производными азобензола, изменялась максимум в 16 раз при цис-транс изомеризации фоточувствительного остатка [57]. Активность липазы В, модифицированной азобензолом, также увеличивалась в 8-52 раза по сравнению с немодифицированным ферментом в результате облучения светом [56]. Следует отметить, что во всех представленных работах обсуждается положение фоточувствительного фрагмента в молекуле фермента для достижения желаемого эффекта [55-58].

Контроль вкл./выкл. ферментативной активности с помощью включения в фоточувствительные матрицы был продемонстрирован для лизоцима [68] и бычьего сывороточного альбумина [66, 67], включенных в матрицы поверхностно-активных веществ, содержащих азобензольный фрагмент. В результате воздействия света фоточувствительные фрагменты претерпевали цис-транс изомеризацию, провоцирующую изменения как в конформации белка, так и во взаимодействии матрицы с белком (Рисунок 7 Б). Так, ферментативная активность лизоцима, включенного в мицеллы на основе азобензолтриметиламмоний бромид, увеличивалась в 8 раз под действием видимого света, который переводил фоточувствительный фрагмент азобензола в транс-форму. Такая изомеризация вызывала частичную денатурацию фермента. Обратный процесс

изомеризации азобензольного фрагмента в цис-форму наблюдался под действием УФ-излучения.

Для контроля вкл./выкл. ферментативной активности с помощью связывания с фоточувствительными фрагментами или матрицами, также как и для подхода, основанного на деблокировании активного центра фермента, необходимы данные о трехмерной структуре молекулы фермента и его активного центра, а также опыт в белковой инженерии и материаловедении. Тем не менее, данный подход может быть универсальным для большинства ферментов.

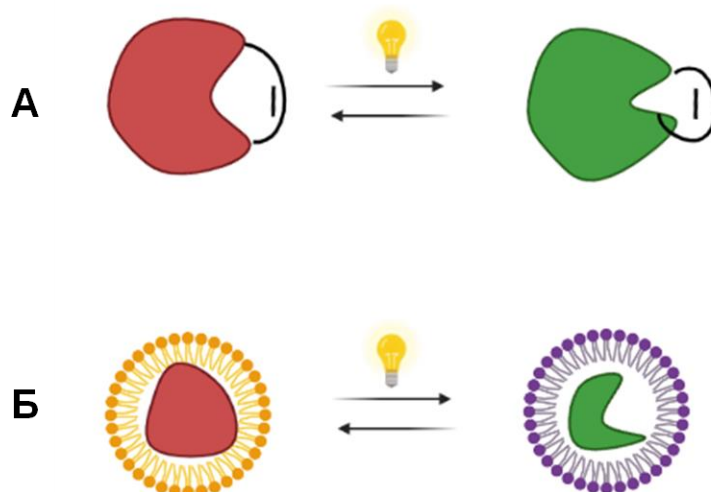


Рисунок 7. Схема обратимых конформационных изменений в молекуле фермента, индуцируемых изомеризацией (А) фоточувствительного фрагмента, связанного с ферментом, (Б) фоточувствительной матрицы, включающей фермент. Красным показан неактивный фермент, зеленым – активный.

б. *Изменения, индуцируемые микроволновым излучением.*

Микроволновое излучение может изменять энергию вибрационных колебаний многих молекул или, другими словами, трансформировать энергию электромагнитного излучения в тепловую [69]. По сравнению с обычным нагревом нагрев с помощью микроволнового излучения имеет несколько особенностей: он происходит (1) быстрее и (2) селективнее [70]. Учитывая данные преимущества, в последние годы наблюдается значительный рост работ, связанных с влиянием микроволнового излучения на биологические объекты, в частности, ферменты [71-73]. Основным механизмом активации ферментов под действием микроволнового излучения заключается в том, что слабые взаимодействия, такие как водородные связи, гидрофобные и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, обеспечивающие стабильность вторичной и третичной структур белка,

могут быть изменены под воздействием электромагнитного излучения. Так, было показано [74], что микроволновое излучение приводит к изменению конформации глюкоамилазы, что в свою очередь может привести к изменениям в кинетике ферментативных реакций [75], а также термической стабильности ферментов [76] и селективности их действия [77]. Кроме того, микроволновое излучение также оказывает влияние на взаимодействие между субстратом и активным центром фермента [78].

Воздействие микроволнового излучения приводит к улучшению протекания многих ферментативных реакций, а полученные результаты могут быть потенциально использованы в химической [79-83] и пищевой промышленности [84-88]. Несмотря на это, в литературе описано сравнительно небольшое число примеров применения данного подхода. При этом выбор ферментов был ограничен липазами, гидролазами и глюкозидазами [89]. Более того, даже для одного типа ферментов, например глюкозидаз, микроволновое излучение могло оказывать противоположный эффект в зависимости от того, из какого источника был выделен тот или иной фермент. Таким образом, применение микроволнового излучения в качестве универсального метода контроля вкл./выкл. активности ферментов кажется весьма спорным, а его реализация потребует проведения большого числа экспериментов по подбору параметров электромагнитного излучения для каждого отдельного фермента.

в. Иммобилизация в стимул-чувствительные гидрогели.

Имобилизация ферментов в стимул-чувствительные гидрогели, гидрогелевые покрытия или гидрогелевые частицы является еще одним общим подходом к контролю вкл./выкл. фермента [90-98]. В данном случае изменение ферментативной активности достигается за счет изменения степени набухания гидрогеля в результате сочетания нескольких факторов: (1) изменение доступности активного центра фермента, (2) изменение конформации фермента, (3) изменение подвижности фермента/субстрата/продукта в порах гидрогеля, (4) изменение в микроокружении фермента (гидрофобность, наличие заряженных групп и т.д.).

Для некоторых полимеров характерно снижение степени набухания при повышении температуры выше определенного значения, называемой критической температурой смешивания (КТС). Такие полимеры чаще всего используют для регуляции иммобилизованных ферментов [90-97]. Изменение активности фермента под воздействием внешнего стимула (изменение температуры) было продемонстрировано для большого числа ферментов, таких как аспарагиназа [90], β -галактозидаза [91, 95], каталаза [92], трипсин [93], лакказа [94], липаза [96] и уреазы [97], иммобилизованных в гидрогелях на основе N-изопропилакриламида [94-96], сополимеров N-изопропилакриламид-

акриламида [90, 91, 93], изопрропилакриламид-гидроксиакриламида [92], N-изопрропилакриламид-полиметиленгликольметакрилата [97].

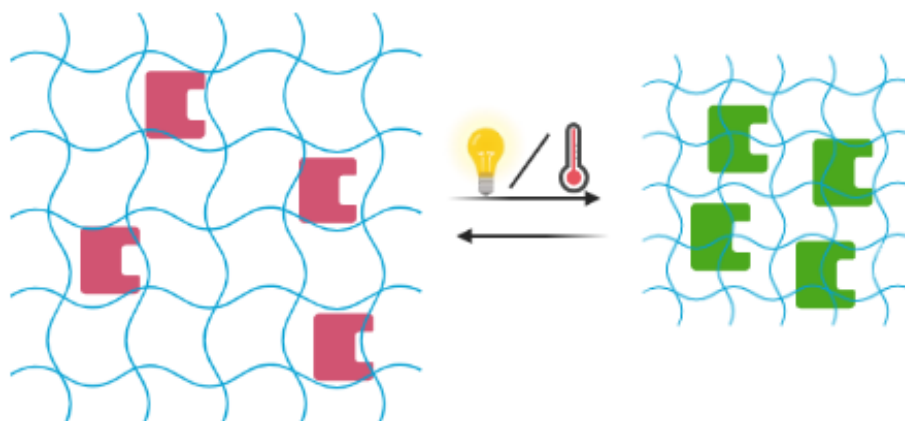


Рисунок 8. Схема, описывающая один из вариантов изменения активности ферментов, иммобилизованных в стимул-чувствительные гидрогели, для которых изменяется степень набухания под действием внешнего стимула. Красным показан неактивный фермент, зеленым – активный.

Стоит отметить, что в представленных работах изменение активности иммобилизованного фермента носило разнонаправленный характер. В ряде исследований активность фермента возрастала при набухании гидрогеля [95, 96], в то время как в других работах активность не изменялась [90] или снижалась [90, 91, 93, 96, 97]. Также изменение активности иммобилизованных ферментов сильно зависело от состава гидрогеля. Вероятно, факторами, влияющими на поведение фермента в ответ на внешний стимул, являются изменение степени набухания, размера пор гидрогеля, а также влияние температуры на активность фермента. Так, повышение температуры среды может приводить как к увеличению активности фермента (при температурах ниже температуры инактивации), так и к ее снижению (при температурах выше температуры инактивации). В то же время повышение температуры приводит к снижению степени набухания полимеров, обладающих КТС, что также может разнонаправлено сказаться на активности инкапсулированного фермента

г. Локальное изменение температуры.

Одним из методов контроля вкл./выкл. активности ферментов является локальный разогрев среды с помощью МНЧ (ферромагнитных [99, 100] или суперпарамагнитных [101]) или золотых НЧ, обладающих плазмонными свойствами [102]. В случае ферментов,

иммобилизованных на МНЧ, изменение температуры происходит за счет включения и выключения внешнего ВЧПМП, а для ферментов, иммобилизованных на плазмонных НЧ золота, за счет облучения светом (Рисунок 9).

Так, в некоторых работах обсуждается, что локальная температура вблизи поверхности суперпарамагнитных НЧ при воздействии ВЧПМП может варьироваться между 25 и 90°C, в то время как температура реакционной среды остается практически неизменной [99, 101]. Предполагается, что с помощью явления магнитной гипертермии можно локально достичь условий, оптимальных для функционирования термофильных ферментов. Благодаря такому подходу были селективно и удаленно активированы α -амилаза из *Bacillus licheniformis* и L-аспартатоксидаза из *Solfolobus tokodaii*, иммобилизованные на поверхности НЧ оксида железа [101].

Также было показано, что облучение золотых НЧ светом приводит к локальному повышению температуры, причем этот эффект зависит от размера и формы НЧ [102]. Так, было показано, что активность глюкокиназы, иммобилизованной на золотых наностержнях, повышалась в 1,5 раза в результате облучения светом в ближней ИК области. В более поздних работах были продемонстрированы подходы, в которых локальный разогрев, индуцированный лазерным излучением, приводил к повышению активности ферментов, иммобилизованных на полимерных НЧ, например, для НЧ полилактат-полидофамин, содержащих α -амилазу [103, 104] и графеновых материалах, например, углеродные нанотрубки, содержащие глюкозилтрансферазу [105]. Также была показана активация термолизина, иммобилизованного на МНЧ, под действием ВЧПМП [106].

Кроме того, в литературе описаны методы контроля вкл./выкл. активности ферментов, в которых совместно используют эффект локального разогрева МНЧ в ВЧПМП и изменение степени набухания КТС гидрогелей при изменении температуры. При такой комбинации возможно два способа локализации иммобилизованного фермента: (1) в гидрогеле, содержащем МНЧ [107, 108], или (2) в полимерной оболочке, покрывающей МНЧ [109]. Локальное повышение температуры под действием ВЧПМП приводит к снижению степени набухания гидрогеля и изменению активности фермента [107, 108]. Таким образом было продемонстрировано изменение активности инвертазы [107], β -галактозидазы [108] и трипсина [109], используя сополимер N-изопропилакриламид-акриламид в качестве полимера.

Использование МНЧ или плазмонных наночастиц золота в комбинации с магнитным полем или светом, соответственно, позволяющих точно контролировать степень нагрева, перспективны не только для контроля активности термофильных ферментов, но и

мезофильных (см. главу 1.1.2.4) [5]. Процесс иммобилизации ферментов в гидрогели или на поверхности НЧ металлов, а также температурные зависимости ферментативных реакций достаточно хорошо изложены в литературе [110-113]. Таким образом, создавая оптимальные условия для работы ферментов, потенциально возможно создать системы контроля вкл./выкл. ферментативной активности для любых ферментов. Комбинация различных частиц, реагирующих на различные стимулы (различные частоты МП или длины волн), в будущем, возможно, позволит одновременно регулировать несколько ферментов в одном реакционном сосуде.



Рисунок 9. Схема изменения активности термофильного фермента, иммобилизованного на МНЧ или плазмонных НЧ, под действием внешнего стимула в результате локального повышения температуры. Красным показан неактивный фермент, зеленым – активный.

д. *Электрохимическая стимуляция оксидоредуктаз.*

Одним из примеров контроля вкл./выкл активности фермента может являться электрохимическое стимулирование оксидоредуктаз, которые катализируют окислительно-восстановительные реакции. Поскольку электрический потенциал напрямую связан с энергией Гиббса, такое стимулирование представляется возможным [114]. В ряде случаев поверхность электрода дополнительно модифицируют НЧ, что приводит к увеличению площади его поверхности, и, следовательно, к большей нагрузке фермента и более высокой плотности тока на поверхности электрода [115], что позволяет миниатюризировать электрохимические устройства.

Наиболее часто при электрохимической стимуляции ферментов используют оксидоредуктазы, поскольку подвижность электрона в их активном центре высока. При иммобилизации фермента на поверхности электрода необходимо, чтобы активный центр

фермента сохранял геометрию, подходящую для выполнения своей каталитической функции, и не был заблокирован для доступа субстрата.

В методе электрохимической стимуляции активности ферментов наиболее часто используют НЧ золота. Такие НЧ позволяют иммобилизовать фермент в благоприятной для катализа конформации, а также облегчить перенос электрона между поверхностью электрода и простетическими группами фермента, например, гем пероксидазы хрена [116]. С помощью электрохимической стимуляции была увеличена активность цитохрома С [117], лаказы [118], пероксидазы [119], сульфит оксидазы [120, 121], формиатдегидрогеназы [122] и гидрогеназы [123].

Процесс передачи электрона между оксидоредуктазой и поверхностью электрода может идти как напрямую, так и с участием окислительно-восстановительных медиаторов [124]. В первом случае процесс называется прямым переносом электрона (ППЭ), а во втором – опосредованным переносом электрона (ОПЭ). Существует большое количество органических и неорганических молекул, которые могут выступать в качестве окислительно-восстановительных медиаторов. В качестве медиаторов в работах описаны метиленовый синий, берлинская лазурь, теонин, толуидиновый синий, производные хинона, ферроцен и его производные, ионы железа или цианистые комплексы железа [125]. В природе в качестве окислительно-восстановительных медиаторов выступают различные кофакторы в активном центре ферментов (НАД⁺, ФАД, аскорбиновая кислота, флавинмоноклеотид и ионы металлов в активном центре (Mg²⁺, Cu⁺, Mn²⁺)). Несмотря на то, что в последнее время наблюдается рост количества публикаций с ППЭ, сравнительно небольшому числу ферментов свойственен данный механизм [114]. Это связано с тем, что ППЭ происходит только тогда, когда активный центр фермента находится на расстоянии меньшем расстояния туннелирования электрона [126]. Таким образом, главным преимуществом механизма ППЭ является то, что процесс передачи электрона не включает окислительно-восстановительные медиаторы и связанные с ними потери перенапряжения, что делает механизм ППЭ более предпочтительным для промышленного применения [124, 127].

Что касается механизма ОПЭ, для того, чтобы преодолеть ограничения механизма ОПЭ, используют электрохимическую регенерацию кофактора (НАД/НАДН, аскорбиновая кислота/дегидроксиаскорбиновая кислота), иммобилизуя фермент и кофактор на поверхности электрода [128, 129]. Это позволяет снизить расход дорогостоящих окислительно-восстановительных медиаторов при проведении длительных реакций или реакций в проточных системах. Однако в системах, содержащих

ко-иммобилизованные фермент и медиатор, возникают проблемы, связанные со стабильностью и анализом общих кинетических параметров [130].

Несмотря на то, что электрохимическая стимуляция ферментов активно развивается в последние 60 лет и затрагивает такие области биоэлектрохимии, как биосенсорика [131-135], биотопливные ячейки [122, 136-138], биоконденсаторы [139-141] и биореакторы [142-144], данный подход применим только для оксидоредуктаз, что ограничивает его применение в биотехнологии. Более того, большинство оксидоредуктаз используют механизм ОПЭ, что приводит к значительным потерям энергии при их практическом использовании [114].

e. Механическая деформация эластичного носителя.

Во второй половине семидесятых годов XX века основателем кафедры химической энзимологии Ильей Васильевичем Березиным был предложен подход к управлению активностью ферментов, названный ферментативной механохимией [145]. В данном подходе эластичный носитель, такой как нейлон или вискоза, на котором был иммобилизован фермент, подвергали механическому растягиванию, что приводило к резкому снижению активности фермента. Такой эффект был обратим: при релаксации носителя наблюдалось восстановление активности фермента. Авторы объясняют данный эффект следующим образом: если молекула фермента связана с носителем более чем одной ковалентной связью, то расстояние между точками крепления фермента на поверхности носителя должно возрастать в результате механического растягивания носителя. В таком случае на молекулы фермента будут действовать силы, приводящие к конформационным изменениям в структуре белка и инактивации фермента (Рисунок 10). При релаксации носителя расстояния между точками крепления фермента на поверхности носителя возвращаются к начальным значениям, в результате чего происходит релаксация структуры фермента. С помощью такого подхода на кафедре химической энзимологии была показана возможность управлять активностью ХТ, трипсина и миозина [146]. В дальнейшем, используя сходный подход, была продемонстрирована возможность управлять активностью глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности мембраны из поливинилхлорида [147] или в многослойном полиэлектролитном геле [148].



Рисунок 10. Схема изменения активности фермента, иммобилизованного на эластичном носителе, в результате механического растягивания носителя. Зеленым показан активный фермент, красным – неактивный.

Данный подход может являться общим, поскольку связь между активностью и структурой ферментов представляется бесспорным фактом. В ряде работ было показано, что с помощью данного подхода возможно не только добиваться инактивации фермента, но и изменять его субстратную специфичность [145], что позволяет предположить, что при определенных условиях возможно добиться и повышения активности фермента. Однако, остается неясным, в какой степени силы, приложенные к макроскопическому материалу, влияют на конформацию фермента (микроскопический параметр), поскольку изменение каталитической активности иммобилизованного фермента может происходить в результате изменения доступности субстрата для фермента, а не в результате механической деформации самого фермента.

1.1.1.3. МАГНИТОСТИМУЛИРУЕМЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ

а. Магнитный изотопный эффект.

Научная литература изобилует исследованиями влияния слабых магнитных полей на биологические системы [149-151]. Однако, в относительно небольшом числе попыток независимого повтора исходные результаты обычно оказывались невоспроизводимыми [152, 153]. Ситуацию усложняло отсутствие биофизических механизмов, с помощью которых слабые магнитные поля могли бы взаимодействовать с биообъектами. Ярким исключением являются работы Бучаченко и Кузнецова [154-157], в которых было продемонстрировано влияние магнитного поля на скорость ферментативного синтеза АТФ *in vitro*. Эти исследования примечательны тем, что представленные изменения скоростей ферментативных реакций были значительными, предложен физически правдоподобный механизм воздействия магнитного поля на ферментативную реакцию, а сам процесс имеет большое биологическое значение.

Превращение АДФ в АТФ катализируется рядом магний-зависимых ферментов. В работах Бучаченко и Кузнецова было показано, что скорость синтеза АТФ под действием четырех киназ – АТФ-синтазы, фосфоглицераткиназы, пируваткиназы и креатинкиназы – значительно различается в зависимости от того, какой изотоп магния находился в активном центре фермента. Магний имеет три стабильных изотопа: ^{24}Mg (79%), ^{25}Mg (10%), ^{26}Mg (11%). Вместо монотонной зависимости скорости реакции от массового числа изотопа, которую можно было бы ожидать для классического кинетического изотопного эффекта (КИЭ), было обнаружено, что АТФ синтезируется более чем в два раза быстрее в присутствии изотопа ^{25}Mg , чем в присутствии ^{24}Mg или ^{26}Mg . Авторы этих работ объясняли такой феномен с помощью радикально-парного механизма (РПМ), движущей силой которого является не масса атомного ядра, а его магнитный момент, так называемый, магнитно-изотопный эффект (МИЭ). Из всех трех изотопов только ^{25}Mg является магнитным. Хотя МИЭ менее распространен по сравнению с КИЭ, он является хорошо изученной особенностью химических реакций, в которых пары радикалов являются промежуточными продуктами реакции.

Частым проявлением РПМ является чувствительность парных радикальных реакций к внешним МП [158]. В своих работах Бучаченко и Кузнецов обнаружили, что действительно скорость фосфорилирования для магнитных изотопов магния при приложении МП интенсивностью 80 мТл увеличивалась уже в 4 раза по сравнению с немагнитным изотопом. Авторами был предложен механизм, объясняющий как МИЭ, так и влияние МП. Предполагается, что сверхтонкие взаимодействия магнитного изотопа ^{25}Mg в радикальной паре, состоящей из иона Mg^{+} и радикала АДФ, переводит ее в триплетное состояние. Как синглетное, так и триплетное состояния, переход между которыми является обратимым, могут приводить к образованию продукта фосфорилирования. Однако, для синглетного состояния возможна и обратная реакция, ведущая к исходным реагентам, что не наблюдается для триплетного состояния. Таким образом, наличие триплетного состояния смещает равновесие реакции в сторону продуктов и ускоряет ее.

Стоит отметить, что были предприняты попытки независимо повторить результаты работ Бучаченко и Кузнецова, которые оказались неудачными [159]. В двух независимых экспериментах авторы обнаружили лишь небольшой МИЭ, выраженный в снижении (15%) скорости синтеза АТФ креатинкиназой при использовании магнитного изотопа ^{25}Mg вместо природного магния.

- б. *Влияние на структуру фермента, содержащего ион металла в качестве кофактора.*

Одним из подходов к контролю активности ферментов является эффект влияния МП на активность ферментов, содержащих в своем активном центре ионы металлов в качестве кофакторов [160, 161]. Внешние МП могут вызывать конформационные изменения в белках за счет взаимодействия со специфическими ионами, такими как марганец или железо, выступающими в качестве специфических кофакторов, и, таким образом, регулировать свойства ферментов. Так, было показано, что активность пероксидазы хрена, содержащей гем в качестве кофактора, существенно зависит от параметров магнитного поля. В каталитическом центре пероксидазы хрена содержится ион Fe^{3+} гема, а также два иона Ca^{2+} , которые важны для поддержания структуры фермента и его функционирования. При воздействии МП восстановленная форма гема может проявлять парамагнитные или диамагнитные свойства [89, 162]. Предполагается, что МП может ускорять перенос заряда в активном центре фермента и повышать скорость ферментативной реакции.

1.1.2. МЕТОДЫ НЕОБРАТИМОГО КОНТРОЛЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Необратимый контроль вкл./выкл. фермента означает, что, после того как под воздействием внешнего стимула «переключение» произошло, его нельзя «переключить» обратно. Такой вариант регуляции может быть достигнут либо с помощью «включения» неактивного фермента, либо с помощью «выключения» активного.

1.1.2.1. АКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТА С ПОМОЩЬЮ ПОДХОДА КОНТРОЛИРУЕМОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ИЗ МАТРИЦЫ

Необратимый контроль вкл./выкл. фермента, применимый в биокатализе, может быть осуществлен с помощью фотодegradуемого гидрогеля, содержащего инкапсулированный фермент. Такой способ был использован для активации трипсина, химотрипсина и эластазы, включенных в гидрогель полипропилениминтетраминакрилата, содержащего фоторасщепляемый орто-нитробензиловый фрагмент [163]. При облучении такого гидрогеля светом с длиной волны 365 нм происходило расщепление межмолекулярных связей в полимере, что приводило к разупорядочиванию структуры полимерной сетки, высвобождению фермента из матрицы и, как следствие, повышению его активности (Рисунок 11 А). В другом подходе контролируемое высвобождение фермента происходило за счет образования пор в структуре материала носителя, за счет, например, фототермического эффект [164, 165]. Так, фермент, иммобилизованный в порах КТС полимера, покрывающего НЧ золота был активирован в результате облучения светом ближней ИК-области. При этом высвобождаемая тепловая энергия приводила к образованию пор в полимерной матрице, в результате чего происходило высвобождение фермента. В обсуждаемой работе открытие и закрытие пор являлось

обратимым процессом, в то время как активация фермента была необратимой, поскольку в результате внешнего воздействия весь фермент высвобождался в раствор. С помощью данного подхода была показана контролируемая активация лизоцима [165] и щелочной фосфатазы [164]. В другой работе высвобождаемая при облучении тепловая энергия приводила к необратимому процессу формирования пор в матрице носителя в результате ее полимеризации [166]. Активация фермента с помощью метода контролируемого высвобождения, в целом, может быть применена к любым ферментам при условии, что фермент не проявляет или проявляет низкую активность в связанном состоянии [5].

Еще один подход контролируемого высвобождения фермента, с помощью которого возможно осуществлять контроль вкл./выкл его активности, может служить десорбция фермента с поверхности МНЧ под действием НЧПМП [167]. В данной работе фермент супероксиддусмутаза, электростатически сорбированная на поверхности МНЧ, изменяла свою активность в зависимости от частоты, напряженности и времени обработки НЧПМП. Было обнаружено, что активность фермента возрастала в течение первых пятнадцати минут экспозиции в МП, после чего она снижалась. Эффект наибольшей активации фермента наблюдался при частоте 50 Гц и интенсивности 60 кА/м. Авторы предполагают [167], что ускорение ферментативной реакции происходило вследствие десорбции фермента под действием гидродинамических сил, возникающих при Брауновской релаксации магнитных наночастиц в НЧПМП (Рисунок 11 Б). Однако, при длительной экспозиции МНЧ в магнитном поле происходила их агрегация, что затрудняло дальнейшую десорбцию фермента и снижало его активность. Тем же коллективом авторов была показана возможность высвобождения высокомолекулярного ингибитора ХТ (ИББ) из липосом, модифицированных МНЧ, под воздействием НЧПМП [168]. Брауновская релаксация МНЧ в НЧПМП приводила к разупорядочиванию липосомальной мембраны, в результате чего наблюдалось увеличение степени высвобождения высокомолекулярного ингибитора и снижение активности фермента.

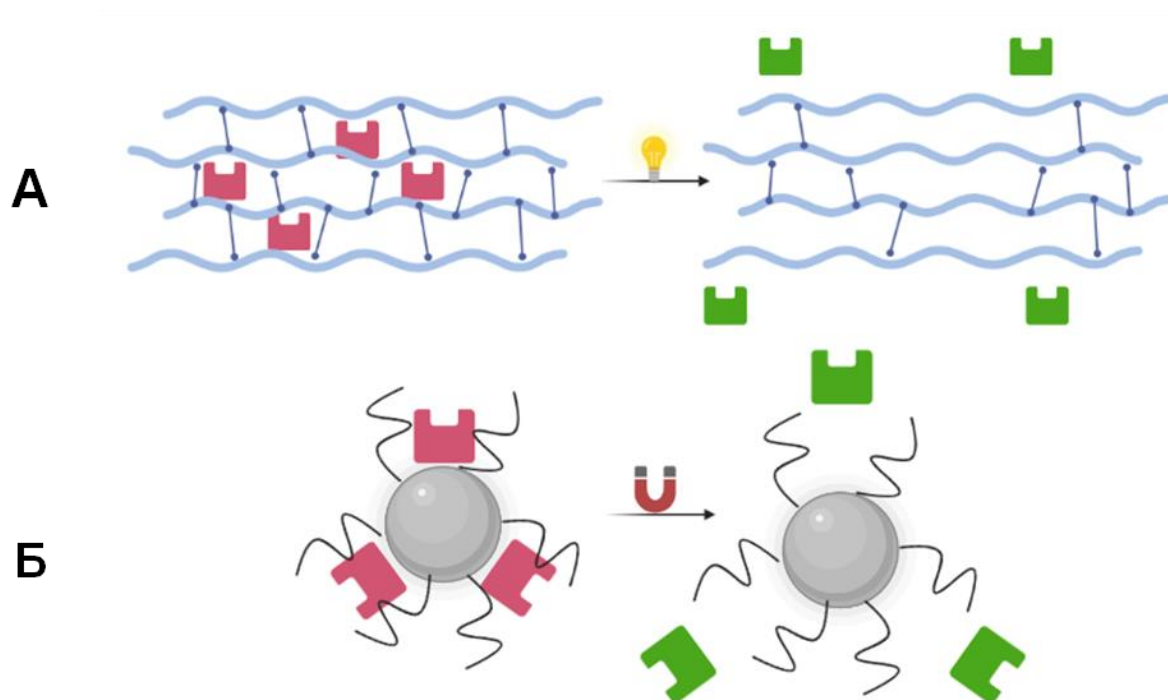


Рисунок 11. Схема необратимого высвобождения молекул фермента из (А) гидрогелей и (Б) с поверхности МНЧ под действием внешнего стимула. Красным показан неактивный фермент, зеленым – активный.

1.1.2.2. АКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТА С ПОМОЩЬЮ ПРЕВРАЩЕНИЯ ПРОФЕРМЕНТА В АКТИВНЫЙ ФЕРМЕНТ

В области доставки лекарственных препаратов достаточно распространенным является подход, в котором накопленное, например, в опухоли неактивное пролекарство превращается в активный агент, например, при расщеплении химической связи под действием внешнего стимула. Схожий подход может быть применен и для контроля вкл./выкл. фермента, хотя в литературе встречаются, в основном, примеры в контексте контроля внутриклеточных процессов, связанных с ферментами рестрикции [169-171].

Обычно для такого контроля вкл./выкл. фермента с помощью превращения неактивного профермента в его активную форму фермент модифицируют фоторазлагаемой молекулой, содержащей, например, фенилацильный [172] или орто-нитробензольный фрагменты [169, 173, 174]. Будучи связанным с такой молекулой, фермент не проявляет или проявляет крайне низкую активность [169, 172-174]. В результате расщепления фоторазлагаемой молекулы под действием внешнего стимула ферментативная активность восстанавливается [169, 170, 172-174] (Рисунок 12). Подобно методам контролируемого высвобождения из матриц, активация фермента с помощью превращения профермента в его активную форму, в общем, применима ко всем ферментам, для которых профермент не проявляет значительной активности.

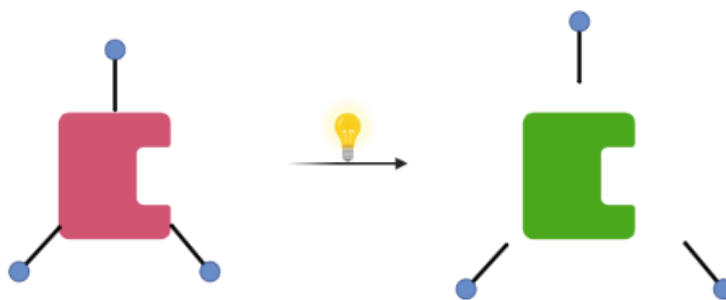


Рисунок 12. Схема необратимой активации фермента, связанного со стимул-чувствительными молекулами, отщепление которых в результате воздействия внешнего стимула приводит к образованию активной формы фермента.

1.1.2.3. АКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТА С ПОМОЩЬЮ СКАЧКА pH, ИНДУЦИРОВАННОГО ЛАЗЕРОМ

Другой подход необратимой активации основан на изменении активности фермента в ответ на удаленно индуцируемое изменение pH [175, 176]. Такое изменение pH может наблюдаться для соединений, которые, например, диссоциируют под действием облучения светом [177]. Данный подход был применен для активации кислой фосфатазы (IV-S) [175, 176]. Под действием облучения светом производные 2-нитро-бензальдегида превращались в 2-нитрозо-бензойную кислоту, что приводило к резкому снижению pH с 8 до 5 и увеличению активности фермента в 26 раз [175, 176]. Недостатком данного подхода является то, что он применим только в том случае, когда фермент демонстрирует четкую зависимость активности от pH в сочетании с высокой стабильностью в широком диапазоне pH.

1.1.2.4. ИНАКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТА С ПОМОЩЬЮ ИЗМЕНЕНИЯ ЛОКАЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ

Наряду с подходом локального изменения температуры для обратимого контроля вкл./выкл. фермента, схожий метод может быть использован для необратимой инактивации ферментов [178-180]. Так, пероксидаза хрена [178] и α -ХТ [180], иммобилизованные на золотых НЧ, были необратимо инактивированы в результате действия лазерного излучения, при котором наблюдалось локальное повышение температуры [180]. Поскольку температура влияет на стабильность многих ферментов, данный метод может быть применим для многих белков [5] при условии, что эти температуры достижимы посредством разогрева НЧ.

1.1.2.5. ИНАКТИВАЦИЯ С ПОМОЩЬЮ ЛОКАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ

Другой метод необратимого контроля вкл./выкл. фермента состоит в использовании фотохромных групп, введенных в молекулу белка, которые под действием облучения светом с определенной длиной волны формируют свободные радикалы, в основном АФК, такие как гидроксильный или супероксид радикал [181-187]. Образующиеся АФК приводят к необратимым изменениям в структуре белка, а, следовательно, нарушают его функционирование [188] (Рисунок 13). При правильном подборе условий такая инактивация может оказаться достаточно локальным методом контроля вкл./выкл. фермента, поскольку АФК являются высокоактивными и короткоживущими молекулами [184, 186, 187, 189]. При этом контроль активности, скорее всего, достижим для всех ферментов, реагирующих на присутствие свободных радикалов [5].

Инактивация с помощью образования свободных радикалов может быть основана на различных подходах:, таких как световая инактивация с помощью хромофора [183, 186, 187, 190] или флуорофора [185, 191] и лазерная инактивация с помощью хромофора [181, 184, 188]. Хромофоры [188] и флуорофоры [185, 191] были конъюгированы с целевыми белками с помощью аффинного связывания, а в случае фототоксичных белков с помощью методов генной инженерии [183]. Такой подход к инактивации белка с помощью фотохромных групп, образующих АФК, может быть использован в различных областях биомедицины, таких как фотодинамическая [188] и антибактериальная [192] терапия, а также в области биотехнологии для регуляции экспрессии генов [193] и изучения мембранных процессов в клетке [188]. В ряде работ обсуждается инактивация ферментов с помощью такого подхода Так, была показана инактивация щелочной фосфатазы [188], β -галактозидазы [186, 188] и ацетилхолинэстеразы [188], конъюгированных с фотохромной молекулой посредством биотин-стрептавидинового взаимодействия [188].



Рисунок 13. Схема необратимой инактивации фермента в результате образования АФК (звездочки). Под действием света молекулы хромофора или фотосенсибилизатора, связанные с молекулой фермента, генерируют АФК, которые приводят к необратимым изменениям в структуре фермента.

1.2. МАГНИТО-НАНОМЕХАНИЧЕСКИЙ ПОДХОД К УПРАВЛЕНИЮ СТРУКТУРОЙ И СВОЙСТВАМИ ФЕРМЕНТОВ

Механохимия – раздел химии, изучающий поведение молекул под действием механического воздействия. Как было сказано в разделе 1.1.1.2 в первых работах, описывающих данный подход для ферментов [145, 146], было показано, что в результате растяжения эластичных носителей, таких как нейлон или вискоза, можно обратимо изменять активность и субстратную специфичность ферментов, иммобилизованных на данных носителях. Авторы предположили, что растягивание носителя приводило к тому, что расстояние между точками крепления фермента на носителе увеличивалось. В результате этого фермент испытывал механический стресс, и, как следствие, его структура изменялась, и наблюдалось снижение ферментативной активности. Позже эти данные были подтверждены в работе Ишиомори [147], в которой в результате растягивания пористой поливинилхлоридной мембраны, содержащей иммобилизованную β -галактозидазу, также наблюдалось снижение каталитической активности фермента. Однако авторами не было напрямую показано, что силы, приложенные к носителю, влияли на конформацию молекулы белка. Также оставался неясным вопрос, изменяет ли растяжение носителя размер его пор и опосредованно доступность субстрата для фермента. Гипотеза о влиянии механического растяжения носителя на конформацию фермента была подтверждена только в 2015 году в работах [148, 194], в которых напрямую было продемонстрировано влияние растягивания носителя на конформацию иммобилизованного белка.

С развитием методов манипуляции одиночными молекулами, такими как атомно-силовая микроскопия [195] или оптический/магнитный пинцет [196], было изучено поведение ряда ферментов под действием механического стимула [197-199]. В большинстве из представленных работ сообщалось о снижении ферментативной активности в результате механического воздействия на молекулу фермента. При этом задача детектирования активности фермента под воздействием механического стимула является крайне нетривиальной. В работах Лю и соавторов [198, 199] такое детектирование было достигнуто с использованием комбинации магнитного пинцета и флуоресцентной микроскопии. Авторы показали, что активность пероксидазы хрена значительно снижалась уже при ее растягивании с силой 1-2 пН. Такое снижение ферментативной активности являлось результатом ухудшения способности фермента связывать субстрат (N-ацетилдигидрокифеноксазин). Наблюдаемые изменения ферментативной активности носили обратимый характер. После снятия механической нагрузки, связывание субстрата с ферментом укоряло процесс перехода фермента из неактивной («растянутой») конформации в активную («нативную»).

Стоит отметить, что методы манипуляции одиночными молекулами не позволяют изменять конформацию и, соответственно, активность всей совокупности молекул фермента в растворе. Данный факт приводит к тому, что представленные выше методы невозможно использовать для манипуляции активностью ферментов в промышленных процессах. В качестве решения данной задачи нашей группой было предложено использовать ферменты, конъюгированные с МНЧ, помещенные в НЧППП [200]. Так, ранее в нашей лаборатории было продемонстрировано значительное снижение каталитической активности трех ферментов: α -ХТ, трипсина и β -галактозидазы, конъюгированных с МНЧ магнетит-золото типа ядро-оболочка. Была предложена схема, объясняющая инактивацию иммобилизованных ферментов под воздействием НЧППП [200, 201], которая заключается в следующем (Рисунок 14):

- а) Система представляет собой агрегат, состоящий из двух МНЧ и молекулы фермента, которая соединяет МНЧ с помощью молекул линкеров.
- б) В отсутствие внешнего МП магнитные моменты μ_i каждой однодоменной магнитной наночастицы ориентированы хаотично.
- в) Под действием внешнего МП с величиной магнитной индукцией \mathbf{B} однодоменные МНЧ стремятся сориентировать магнитный момент μ_i вдоль вектора внешнего поля \mathbf{B} , что позволяет минимизировать энергию магнитной анизотропии. В случае, когда ориентация магнитных моментов происходит вместе с поворотом МНЧ (Брауновская релаксация), молекулы фермента на поверхности МНЧ могут испытывать механический стресс.

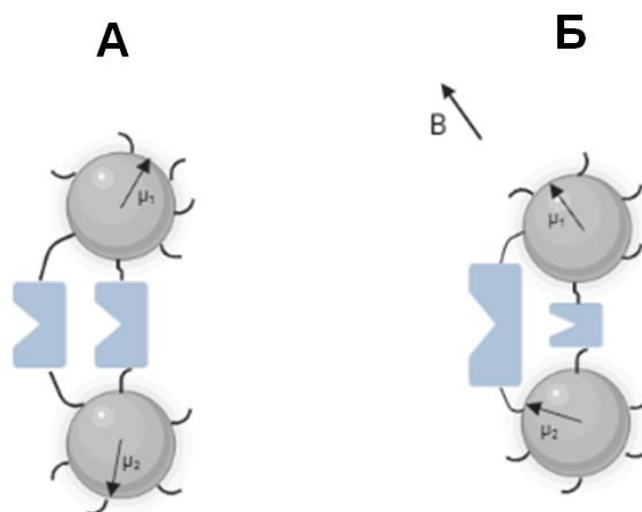


Рисунок 14. Агрегат, состоящий из двух МНЧ, связанных мостиком «линкер-фермент-линкер», с симметрично направленными относительно направления силовых линий МП магнитными моментами μ_i в (А) отсутствии внешнего МП и (Б) в присутствии внешнего МП с вектором магнитной индукции B .

В принципе существует два конкурирующих способа релаксации магнитного момента μ_i однодоменной магнитной наночастицы во внешнем магнитном поле: Неелевский, когда μ_i меняет направление в практически неподвижной однодоменной МНЧ, преодолевая энергию магнитокристаллической анизотропии, и Брауновский, когда вектор магнитного момента μ_i поворачивается вместе с механическим вращением частицы [202]. Для механической стимуляции молекулы белка, связанной с однодоменными магнитными наночастицами, необходимым условием является именно Брауновская релаксация. В связи с этим встает вопрос о подборе оптимальных параметров системы, таких как материал МНЧ, ее размер и форма, а также параметров переменного магнитного поля.

В случае реализации Брауновского механизма релаксации, вращательно-колебательные движения МНЧ во внешнем НЧППП приведут к тому, что молекулы фермента, прикрепленные к поверхности МНЧ, будут испытывать деформации четырех типов: растяжение, скручивание, сжатие и сдвиг. Тип деформации зависит от взаимной ориентации магнитных моментов μ_i МНЧ, направления вектора магнитной индукции МП B и расположения точек крепления фермента к поверхности МНЧ. При этом одновременно могут быть реализованы различные комбинации деформаций. Авторы приводят оценки сил, прикладываемых к белковым молекулам на поверхности МНЧ, в зависимости от размеров МНЧ, содержащих их агрегатов и параметров НЧППП [202]. Эти оценки показывают, что «деформационные наномшины» способны развивать силу, достигающую многих сотен пН, и деформацию прикрепленных

молекул в десятки нм. Такие величины сил и деформаций, безусловно, способны не только существенно изменить межатомные расстояния в активном центре фермента, но и его вторичную/третичную структуру [203-205].

Предложенный подход, в котором МНЧ выступали в качестве «деформационных наномашин», был назван авторами магнито-наномеханическим [206]. Предполагается, что с его помощью можно управлять кинетикой ферментативных реакций *in situ*, влиять на процессы высвобождения лекарственных препаратов, изменяя проницаемость наноконтейнеров, активировать или подавлять биохимические процессы в живых клетках, воздействуя на клеточную стенку, рецепторы, содержащиеся в ней, или другие ее компоненты.

Как было сказано выше, в МНМ подходе стимуляция молекул фермента осуществляется в результате Брауновской релаксации МНЧ, в то время как конкурирующий Неелевский механизм не способен оказывать механическое воздействие на молекулы фермента. Характерные времена релаксации МНЧ по Неелевскому (τ_N) и Брауновскому (τ_B) механизмам описываются уравнениями следующего вида [207]:

$$\tau_N = \tau_0 \frac{\sqrt{\pi} \exp\left(\frac{K_{eff}V}{k_B T}\right)}{2 \sqrt{\frac{K_{eff}V}{k_B T}}} \quad (1)$$

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T} \quad (2)$$

где η - вязкость растворителя, в котором диспергированы МНЧ, k_B – константа Больцмана, T - температура (К), V_H – гидродинамический объем МНЧ, V - объем магнитной составляющей МНЧ, K_{eff} - эффективная константа магнитной анизотропии.

В общем случае характерное эффективное время релаксации (τ) МНЧ в МП будет комбинацией τ_N и τ_B [208]:

$$\tau = \frac{\tau_N \tau_B}{\tau_N + \tau_B} \quad (3)$$

Как видно из уравнения 3, характерное эффективное время релаксации τ , в основном, будет соответствовать тому процессу, характерное время которого будет меньше. Основным параметром, от которого зависят значения τ_B и τ_N , является размер МНЧ, который определяет значения V и V_H . Можно сказать, что при прочих равных условиях существует некое критическое значение радиуса МНЧ R_C , ниже которого МНЧ будет, в основном, релаксировать

по Неелевскому механизму, а выше которого - по Брауновскому [206]. Так, для магнетита, наиболее часто используемого материала для получения МНЧ, $R_C \approx 7$ нм [206].

При обсуждении МНМ подхода возникает вопрос возможного теплового разогрева МНЧ. Следует отметить, что в отличие от эффектов магнитной гипертермии (которые обсуждались в главе 1.1), наблюдаемые обычно при частотах 0,1-1 МГц, МНМ стимуляция ферментов происходит при сверхнизких частотах ПМП (порядка единиц-сотен Гц). При этом в ряде работ, посвященных магнитной гипертермии, проведенных при относительно низких частотах (10-100 кГц), авторы наблюдали эффекты, которые невозможно было объяснить лишь магнитной гипертермией [209-211]. Высказывалось предположение, что ПМП может оказывать нетепловое воздействие, в частности вследствие возбуждения «механических вибраций».

Теоретические расчеты показали, что магнитные поля с частотами $f < 10$ кГц можно считать практически негреющим, так как максимальный эффект разогрева составляет не более 1 К [200, 208]. Более того, энергия $U_M \approx \mu B$, которую магнитное поле может сообщить одному электрону, радикалу, атому, иону, весьма мала. Поскольку для любой из перечисленных частиц величина μ одного порядка с магнетоном Бора $\mu_B = 9,274 \cdot 10^{-24}$ А*м², энергия U_M оказывается на несколько порядков величины меньше тепловой энергии $U_T \approx kT \approx 0,026$ эВ (при $T = 300$ К). Например, для электрона энергия $U_M \approx 10^{-3} U_T$ при $B = 0,5$ Тл и $T = 300$ К. Такое поле будет считаться слабым с точки зрения термодинамики. Величина U_M , а тем более энергия кванта поля $E_q = hf$ несопоставимы с типичными значениями энергии активации биохимических реакций $U_a \approx 0,1-1$ эВ. Например, в магнитном поле с частотой $f = 100$ кГц величина $E_q < 10^{-9}$ эВ. Следовательно, такие поля являются слабыми и с точки зрения квантовой механики.

С физической точки зрения наличие МНЧ в магнитонеупорядоченной среде (водный раствор, ткани организма) приводит к усилению энергетического действия МП на биохимические системы. Так, НЧ магнетита диаметром 8 нм приобретает в поле $B = 0,5$ Тл энергию $U_M \approx J_S(4/3)\pi R_m^3 \rho_m B \approx 100kT$ ($J_S \approx 80$ кА/м² – намагниченность насыщения магнетита, $\rho_m = 5400$ кг/м³ – плотность магнетита), которая на 5 порядков больше, чем энергия одного электрона или радикала. Таким образом, МНЧ становятся основными мишенями влияния переменного МП, обеспечивая высокую чувствительность системы к внешним магнитным стимулам.

Еще одним вопросом, который необходимо затронуть, является теплогенерация самими МНЧ в результате преодоления энергии магнитной анизотропии в процессе релаксации во внешнем ПМП. Этот вопрос специально обсуждался в работе [200], в которой было показано,

что в НЧПМП (1-100 Гц) повышение температуры на поверхности МНЧ не может превышать 10^{-6} К, а диссипация тепла должна происходить крайне быстро, что не приводит к образованию температурного градиента.

Использование МНМ подхода получило бурное развитие в последнее десятилетие (Рисунок 15). Так, была показана возможность контролируемого высвобождения низко- и высокомолекулярных соединений из наноконтейнеров [168, 212-214], удаленного контроля функциями живых клеток [215-217], а также их пролиферации [218, 219]. Однако в научной литературе практически не встречаются работы, посвященные МНМ стимуляции ферментов, кроме нескольких работ [200, 220-222]. Данная тема представляет не меньший интерес, чем биомедицинское применение МНМ подхода. Ее развитие может позволить разработать новые методы удаленного контроля свойств ферментов, таких как активность, субстратная специфичность и селективность. Не менее важным может быть и возможность исследования взаимосвязи структура-функция ферментов. Стоит отметить, что в представленных работах авторы сосредоточили свое внимание на наблюдении за влиянием НЧПМП на активность в зависимости от параметров НЧПМП, длины линкера и соотношения конъюгатов состава МНЧ-фермент и МНЧ-фермент-МНЧ. Так, было показано, что наибольший эффект влияния НЧПМП на активность конъюгированного ХТ наблюдался для коротких линкеров [220]. При этом в случае, когда в качестве линкера выступала высокомолекулярное соединение, эффект НЧПМП на активность ХТ отсутствовал. Изменяя количество ХТ, добавляемого в реакцию конъюгации с МНЧ, были получены смеси конъюгатов с различным соотношением МНЧ-фермент и МНЧ-фермент-МНЧ, степень инактивации которых под воздействием НЧПМП была различна [221, 222]. Так, наибольший эффект НЧПМП наблюдался для образца, в котором содержание конъюгатов состава МНЧ-ХТ-МНЧ было наибольшим, поскольку эффективность МНМ подхода определяется именно наличием таких агрегатов.

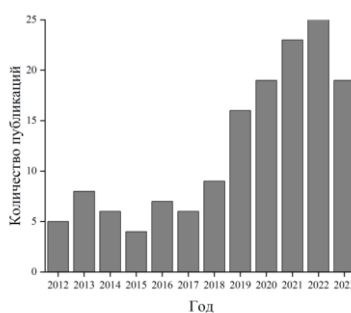


Рисунок 15. Число публикаций по запросу «magneto-mechanical» в базе данных PubMed с января 2012 по август 2023.

Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Хлорид железа (II) тетрагидрат, хлорид железа (III), золотохлорводородная кислота тригидрат, цитрат натрия трехводный, лимонная кислота, соляная кислота (37% водный раствор), аммиак (29% водный раствор), хлорная кислота (70% водный раствор), липоевая кислота, цистамин дигидрохлорид, EDC, S-NHS, ХТ, NSAAPFpNA, ПНФТМА, ТРИС, гидроксид натрия, β -никотинамид адениндинуклеотида гидрат (НАД⁺) >99%, пентакарбонил железа, 1,2-гексадекандиол, олеиновая кислота, олеиламин, 1-октадецен, PDAM, ДМФА (абс.), азотная кислота (конц.), ИТ, ИББ, дофамин гидрохлорид, серная кислота (конц.), гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, феррозин, аскорбиновая кислота, ацетат аммония, хлорид калия, карбонат калия были приобретены у фирмы Sigma-Aldrich (США). АДГ была приобретена у фирмы Reachim (Венгрия). 1,4 диоксан, ацетонитрил, гексан, изопропиловый спирт, этанол (96% водный раствор), хлороформ, метанол были приобретены у фирмы Криохром (Россия). mPEG-NHS (5000 г/моль) был приобретен у фирмы Nanocs (США). Нитрит натрия был приобретен у фирмы Реахим (Россия). Для всех экспериментов использовали деионизованную воду с сопротивлением 18,2 МОм/см, полученную с помощью установки Werner EasyPure II (Германия).

2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.2.1. СИНТЕЗ МНЧ

2.2.1.1. СИНТЕЗ МНЧ ТИПА ЯДРО ОБОЛОЧКА

2.2.1.1.1. СИНТЕЗ МАГНИТНЫХ ЯДЕР

650 мг хлорида железа (III) и 398 мг хлорида железа (II) тетрагидрата растворили в 5 мл 2М соляной кислоты. Полученный раствор прикапывали к 50 мл 0,7М раствора амиака, и перемешивали в течение 30 мин. при комн. темп. НЧ магнитных ядер декантировали с помощью магнита, промывали 50 мл 2М хлорной кислоты, затем вновь декантировали с помощью магнита и диспергировали НЧ в 50 мл деионизованной воды при помощи ультразвуковой бани.

2.2.1.1.2. ПОКРЫТИЕ МАГНИТНЫХ ЯДЕР ЗОЛОТОЙ ОБОЛОЧКОЙ

К 20 мл кипящего водного раствор, содержащего 35 мг золотохлорводородной кислоты тригидрата, добавляли 5 мл свежеприготовленной суспензии НЧ магнитных ядер (полученных на предыдущей стадии) и продолжали кипятить в течение 10 мин с обратным холодильником при интенсивном перемешивании. Затем добавляли 5 мл водного раствора цитрата натрия (80

мМ) и продолжали кипятить с обратным холодильником при интенсивном перемешивании еще 5 мин, после чего нагрев выключали, раствор охлаждали до комн. темп. Полученные НЧ использовали для функционализации поверхности без очистки.

2.2.1.2. СИНТЕЗ МНЧ ТИПА ГАНТЕЛЬ (ГМНЧ)

В трехгорлую колбу, снабженную термометром и газоподводящей трубкой добавляли 20 мл 1-октадецена, 2 мл олеиламина, 1,9 мл олеиновой кислоты и 2,584 г 1,2-гексадекандиола. Смесь нагревали при перемешивании до 120°C, подключали ток аргона к газоподводящей трубке и выдерживали смесь при этой температуре в течение 30 минут. Затем добавляли 0,3 мл пентакарбонила железа, перемешивали 3 мин, после чего добавляли смесь, содержащую 5 мл октадецена, 0,5 мл олеиламина и 38 мг золотохлорводородной кислоты тригидрата. К колбе подключали обратный холодильник и увеличивали температуру смеси со скоростью 25°/мин до момента закипания смеси (~310°C). Смесь кипятили в течение 45 мин, после чего, не выключая перемешивания, охлаждали до комн. темп. и выдерживали 1 час на воздухе. Полученные НЧ отделяли при помощи центрифугирования (4 раза по 10 мин при 6000g) с добавлением изопропанола и затем диспергировали в 20 мл гексана.

2.2.2. ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ СИНТЕЗИРОВАННЫХ МНЧ

2.2.2.1. ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ МНЧ ТИПА ЯДРО-ОБОЛЧКА СЕРОСОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ

Для функционализации МНЧ типа ядро-оболочка липоевой кислотой или цистамином (образцы МНЧ-ЛК и МНЧ-ЦА, соответственно) к 10 мл суспензии синтезированных МНЧ типа ядро-оболочка медленно по каплям добавляли 10 мл водного раствора, содержащего $7 \cdot 10^{-8}$ М лиганда. Суспензию перемешивали 12 часов при комн. темп., после чего избыток лиганда удаляли с помощью трех циклов диализа относительно 1 л деионизованной воды в течение 12 часов.

2.2.2.2. ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ГМНЧ ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТОЙ (ГМНЧ-ЛК)

К 20 мл суспензии ГМНЧ в гексане добавляли 20 мг липоевой кислоты. Суспензию перемешивали 12 часов, после чего осаждали НЧ с помощью магнита. После удаления надосадочной жидкости образец высушивали в токе аргона.

2.2.2.3. СИНТЕЗ НИТРОДОФАМИНА [223]

В 15 мл деионизованной воды, охлажденной до 2°C, растворяли 0,5 г дофамина гидрохлорида и 0,63 г нитрита натрия. К полученному раствору медленно по каплям добавляли

2,5 мл 20% серной кислоты так, чтобы температура раствора не превышала 5°C. После добавления серной кислоты раствор перемешивали 12 часов при комн. темп. Выпавший осадок отфильтровали, дважды промыли ледяной водой и ледяным метанолом. Осадок сушили под вакуумом в течение трех дней. Структура синтезированного нитродофамина была подтверждена с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии (см. Приложение)

2.2.2.4. СИНТЕЗ КОНЬЮГАТА НИТРОДОФАМИН-ПЭГ

К 2 мл раствору хлороформа, содержащему 33 мг mPEG-COOH, добавляли 1 мл ДМФА, содержащего 1,65 мг нитродофамина и 13 мг безводного карбоната калия. Раствор перемешивали 2 часа при комн. темп., после чего сразу использовали для функционализации поверхности ГМНЧ.

2.2.2.5. ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ГМНЧ КОНЬЮГАТОМ НИТРОДОФАМИН-ПЭГ (ПЭГ-ГМНЧ-ЛК)

5 мг ГМНЧ, функционализированных липоевой кислотой, растворяли в 1 мл хлороформа на УЗ-бане, после чего добавляли 3 мл раствора (смесь хлороформ-ДМФА), содержащего конъюгат нитродофамин-ПЭГ (полученного на предыдущей стадии). Смесь перемешивали 12 часов, после чего хлороформ упаривали на роторном испарителе. К оставшемуся раствору добавляли 20 мл деионизованной воды и диализовали три раза относительно 1 л деионизованной воды в течение 6 часов.

2.2.3. СИНТЕЗ АГРЕГАТОВ МНЧ С БЕЛКАМИ

2.2.3.1. СИНТЕЗ АГРЕГАТОВ МНЧ С ХТ

Образец МНЧ-ЛК-ХТ синтезировали с помощью одностадийного карбодиимидного метода. Для этого к 4 мл суспензии МНЧ-ЛК ($24,3 \times 10^{10}$ НЧ/мл) добавляли 2,66 мл 20 мМ цитратного буфера (рН 4,5), 3,34 мг ХТ, 0,2 мг EDC и 0,21 мг S-NHS. Раствор перемешивали 1,5 часа при комн. темп., после чего образцы очищали центрифугированием (3 раза при 4800g) и растворяли в 20 мМ цитратном буфере (рН 4,5).

Образец МНЧ-ЦА-ХТ синтезировали аналогично образцу МНЧ-ЛК-ХТ. 2,4 мл суспензии МНЧ-ЦА ($3,28 \times 10^{10}$ НЧ/мл) смешивали с 0,8 мл 20 мМ цитратного буфера (рН 4,5), 0,2 мг ХТ, 0,42 мг EDC и 0,42 мг S-NHS. Все остальные шаги проводили аналогично синтезу МНЧ-ЛК-ХТ.

Образец МНЧ-ХТ синтезировали с помощью двухстадийного карбодиимидного метода. Для этого к 0,75 мл суспензии МНЧ-ЛК добавляли 0,2 мл 20 мМ цитратного буфера (рН 4,5), 0,7 мг EDC и 0,2 мг S-NHS. Раствор перемешивали 10 мин при комн. темп., после чего

центрифугировали в течение 5 минут (4500g), осадок ресуспендировали в 1 мл 20 мМ цитратного буфера (pH 4,5). После этого к активированным МНЧ добавляли 0,6 мг ХТ, раствор перемешивали 1,5 час при комн. темп. Очистку от несвязанного с МНЧ ХТ проводили с помощью трех циклов центрифугирования (4500g) в течение 5 мин, растворяя осадок в 1 мл 20 мМ цитратного буфера (pH 4,5).

Образец ГМНЧ-ХТ синтезировали с помощью двухстадийного карбодиимидного метода. Для этого к 1 мл суспензии ПЭГ-ГМНЧ-ЛК добавляли 1,5 мл 20 мМ цитратного буфера (pH 4,5), 0,25 г EDC и 0,25 мг S-NHS. Раствор перемешивали 15 мин при 4°C, после чего добавляли 1,5 мг ХТ и перемешивали еще 1,5 часа при 4°C. После окончания реакции конъюгации образцы очищали от несвязанного фермента с помощью магнитной декантации, растворяя осадок в 20 мМ цитратном буфере (pH 4,5).

2.2.3.2. СИНТЕЗ АГРЕГАТОВ МНЧ С АДГ

Агрегаты МНЧ с АДГ синтезировали с помощью двухстадийного карбодиимидного метода. Для этого суспензию МНЧ-ЛК ($24,3 \cdot 10^{10}$ частиц/мл), содержащую EDC и S-NHS, перемешивали на шейкере при 4°C в течение 10 мин. После этого раствор центрифугировали (6000g), а осадок ресуспендировали в 0,5 мл 5 мМ фосфатного буфера (pH 6,0), содержащего АДГ. Соотношения сшивающих агентов (EDC и S-NHS), а также фермента приведены в Таблице 1. EDC и S-NHS брали в эквимольном соотношении. Реакционную смесь перемешивали при 4°C в течение 1,5 часов, после чего агрегаты МНЧ-АДГ-МНЧ (образцы D1-D4) отделяли с помощью трех циклов центрифугирования (6000g), ресуспендируя в 0,5 мл 20 мМ ТРИС буфера (pH 8,2).

Таблица 1. Соотношения АДГ:МНЧ и EDC/S-NHS:АДГ, (соотношение EDC:S-NHS 1:1), использованные в реакции конъюгации. Концентрация МНЧ для реакции конъюгации составила $24,3 \cdot 10^{10}$ НЧ/мл. Молекулярная масса АДГ 150 кДа.

Образец	Соотношение АДГ:МНЧ-ЛК	Соотношение EDC/S-NHS:АДГ
D1	10000:1	200:1
D2	10000:1	20:1
D3	30000:1	65:1
D4	30000:1	6.5:1

2.2.3.3. СИНТЕЗ АГРЕГАТОВ МНЧ-ИТ

Образец МНЧ-ИТ синтезировали аналогично образцу МНЧ-ХТ, используя вместо ХТ ИТ (0,6 мг).

2.2.3.4. СИНТЕЗ АГРЕГАТОВ ГМНЧ-ИББ

Образец ГМНЧ-ИББ синтезировали аналогично образцу ГМНЧ-ХТ. Для этого к 0,3 мл суспензии ПЭГ-ГМНЧ-ЛК добавляли 0,45 мл 20 мМ буфера, 0,125 г ED и 0,125 мг S-NHS. Раствор перемешивали 15 мин при 4°C, после чего добавляли 43 мкг ИББ и перемешивали еще 1,5 часа при 4°C. После окончания реакции конъюгации образцы очищали от несвязанного фермента с помощью магнитной декантации, растворяя осадок в 20 мМ цитратном буфере (pH 4,5).

2.2.4. ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ СИНТЕЗИРОВАННЫХ МНЧ И АГРЕГАТОВ МНЧ С БЕЛКАМИ

2.2.4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ГМНЧ [224]

В пробирке смешивали 20 мкл суспензии ГМНЧ в гексане и 80 мкл царской водки, раствор перемешивали 1 час при 80°C, после чего добавляли 9,9 мл деионизованной воды. К 0,4 мл полученного раствора добавляли 0,2 мл деионизованной воды и 40 мкл раствора, содержащего 32 мг феррозина, 3,85 г ацетата аммония и 3,5 г аскорбиновой кислоты, после чего 0,3 мл раствора переносили в лунку планшета и измеряли поглощение при 560 нм на приборе SpectraMax M5 (США). Концентрацию Fe^{3+} определяли из градуировочной кривой стандартных растворов Fe^{3+} (0-200 мкг/мл).

2.2.4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП НА ПОВЕРХНОСТИ ПЭГ-ГМНЧ-ЛК

Количество карбоксильных групп липоевой кислоты на поверхности ПЭГ-ГМНЧ-ЛК определяли с помощью флуоресцентной метки PDAM, которая селективно связывается с карбоксильными группами. Схема определения, представленная на Рисунке 16, состояла из нескольких стадий. На первой стадии (Рисунок 16 А, Б) ПЭГ-ГМНЧ-ЛК смешивали с раствором PDAM в смеси вода:диоксан 1:1. Раствор перемешивали в течение 1,5 часов при комн. темп., после чего НЧ осаждали с помощью магнита. На второй стадии (Рисунок 16 В) осадок растворяли в водном растворе цианида калия (1 мМ), который «растворял» золото (окисление золота кислородом воздуха с образованием стабильного комплекса $[Au(CN)_2]^-$), в результате чего молекулы липоевой кислоты, модифицированные PDAM, переходили в раствор. На третьей стадии (Рисунок 16 Г) с помощью магнитного декантирования из раствора удаляли НЧ магнетита и измеряли сигнал флуоресценции в надосадочной жидкости ($\lambda_{ex} = 340$ нм $\lambda_{em} = 395$ нм) на приборе SpectraMax M5 (США). Концентрацию карбоксильных групп определяли помощью градуировочной кривой стандартных образцов липоевой кислоты в диапазоне концентраций 0,1-1 мкМ.

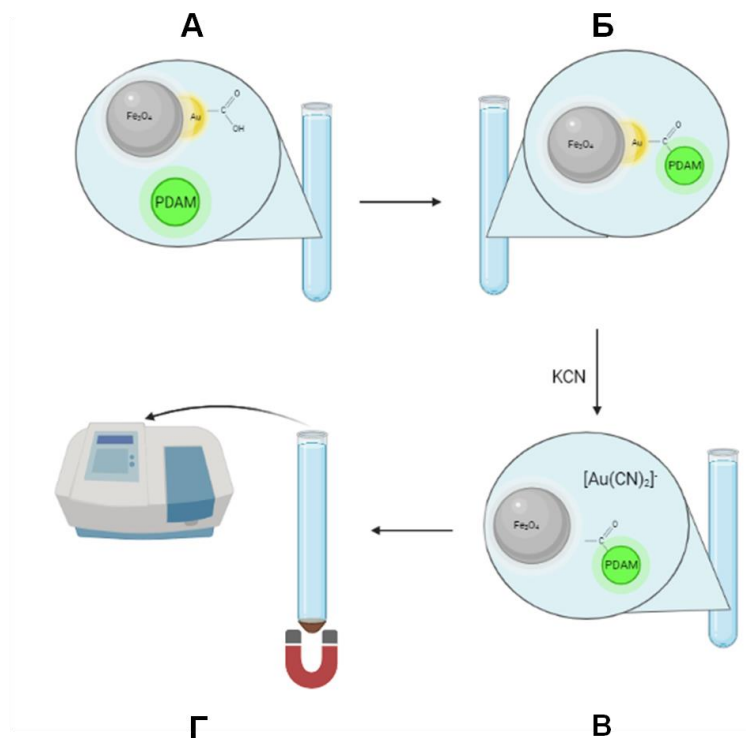


Рисунок 16. Схема определения концентрации карбоксильных групп липоевой кислоты на поверхности ПЭГ-ГМНЧ-ЛК. **(А, Б)** Образование конъюгата в результате реакции между ПЭГ-ГМНЧ-ЛК и PDAM. **(В)** «Растворение» золота в результате добавления к смеси **Б** цианида калия. **(Г)** Удаление МНЧ с помощью магнита из раствора и измерение сигнала флуоресценции.

2.2.4.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРОВ И КОНЦЕНТРАЦИЙ МНЧ МЕТОДОМ NTA

Гидродинамический размер и концентрацию МНЧ определяли с помощью метода NTA на приборе NanoSight NS500 (Malvern, Великобритания), оборудованном лазером (80 мВт) с длиной волны 532 нм, согласно инструкции производителя. Анализ полученных результатов производили в программе NanoSight 2.3 (Malvern, Великобритания).

2.2.4.4. ПЭМ

Размер и морфологию образцов изучали с помощью метода ПЭМ. Для этого 10 мкл раствора НЧ наносили на медную сетку для микроскопии, после чего каплю высушивали на воздухе. Регистрацию изображений НЧ в режиме светлого поля проводили на приборе JEM 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 50-100 кВ. Средний размер НЧ рассчитывали на основе ПЭМ-микрофотографий путем анализа не менее ста НЧ для каждого образца в программе ImageJ (США).

2.2.4.5. МЁССБАУЭРОВСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Для изучения фазового состава магнитных ядер использовали метод мессбауэровской спектроскопии. Спектры поглощения ядер ^{57}Fe регистрировали на приборе MS-1104Em (Южный Федеральный Университет, Россия) при комн. темп. в режиме пропускания, используя ^{57}Co в качестве источника. Анализ спектров проводили программе Univem MS, определяя относительные площади спектров симуляции.

2.2.4.6. DLS

ζ -потенциал синтезированных МНЧ определяли с помощью метода DLS на приборе ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Среднее значение и стандартное отклонение ζ -потенциала было получено из трех измерений каждого образца, растворенного в 10 мМ растворе хлорида калия. Для каждого измерения проводили 20 циклов регистрации ζ -потенциала при 20°C. Анализ полученных данных проводили в программе ZetaSizer (Malvern, Великобритания), используя модель Смолуховского.

2.2.4.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ ХТ

Концентрацию активных центров ХТ определяли спектрофотометрически, измеряя начальный выброс окрашенного продукта реакции ферментативного гидролиза ПНФТМА - 4-нитрофенола. Кинетические кривые накопления продукта регистрировали при 400 нм на приборе SpectraMax M5 (США). Концентрацию активных центров определяли, экстраполируя прямолинейный участок кинетической кривой к нулевому времени. Коэффициент молярного поглощения определяли с помощью полного гидролиза НФТМА в 0,1 М растворе гидроксида натрия.

2.2.5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЧПМП НА КИНЕТИКУ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

2.2.5.1. ВЛИЯНИЕ НЧПМП НА КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ НАТИВНОГО ХТ И ХТ В АГРЕГАТАХ ТИПА МНЧ-ХТ-МНЧ

За активностью как нативного ХТ, так и ХТ в составе агрегатов типа МНЧ-ХТ-МНЧ следили спектрофотометрически, измеряя начальные скорости реакции гидролиза NSAAPFrNA при длине волны 405 нм. Для этого пробирку, содержащую фермент в 20 мМ ТРИС буфере (рН 8,2), помещали в генератор магнитного поля Top 01/12 («Нанодиагностика», Россия), снабженный системой термостатирования. Образцы подвергали воздействию НЧПМП с частотой 50 Гц и величиной магнитной индукции 140 мТл в течение трех циклов

«пульсирующего» НЧПМП (Пульс/Пауза = 1 мин/30 с). Температуру в пробирке контролировали с помощью встроенного термодатчика. После окончания воздействия НЧПМП образцы переносили в лунки планшета, добавляли 2 мкл раствора субстрата (0,1-10 мМ) в смеси диоксан:ацетонитрил 1:1 и записывали кинетические кривые в течение трех минут на приборе SpectraMax M5 (США). Изменения концентрации продукта реакции – паранитроанилина – определяли, используя значение коэффициента молярного поглощения $\epsilon = 9500 \text{ (М*см)}^{-1}$ [225]. Кинетические параметры (K_M и V_M) нативного и иммобилизованного ХТ определяли, строя зависимости начальной скорости реакции V от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка.

2.2.5.2. ВЛИЯНИЕ НЧПМП НА АКТИВНОСТЬ АДГ В СОСТАВЕ АГРЕГАТОВ С МНЧ

За ферментативной активностью АДГ в составе агрегатов с МНЧ следили спектрофотометрически, измеряя изменение концентрации НАДН при длине волны 340 нм в реакции окисления этанола. Воздействие НЧПМП проводили аналогично воздействию на ХТ, описанному в пункте 2.2.5.1. После окончания воздействия НЧПМП к раствору добавляли раствор НАД⁺ и этанол и записывали кинетические кривые в течение пяти минут на приборе SpectraMax M5 (США). Концентрацию НАДН определяли, используя значение $\epsilon = 6200 \text{ (М*см)}^{-1}$ [226]. Значение остаточной активности, используемое для изучения влияния НЧПМП на ферментативную активность, определяли как:

$$\text{Остаточная Активность} = \frac{V_{\text{НЧПМП}}}{V} * 100\% , \quad (4)$$

где $V_{\text{НЧПМП}}$ и V – начальные скорости реакции, катализируемые ферментом в присутствии или отсутствии НЧПМП, соответственно.

2.2.5.3. ВЛИЯНИЕ НЧПМП НА АКТИВНОСТЬ ХТ В СИСТЕМЕ МНЧ-ФЕРМЕНТ/МНЧ-ИНГИБИТОР

За активностью ХТ в составе агрегатов МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ и ГМНЧ-ХТ-ИББ-ГМНЧ, полученного смешением образцов МНЧ-ХТ и МНЧ-ИТ или ГМНЧ-ХТ и ГМНЧ-ИББ, соответственно, следили спектрофотометрически, изучая реакцию гидролиза субстрата NSAAPFPNA при длине волны 405 нм. Для этого кювету, содержащую суспензию агрегатов в 20 мМ ТРИС буфере рН (8,2), добавляли раствор субстрата в смеси диоксан:ацетонитрил (1:1), кювету помещали в генератор магнитного поля Astra M-Sp («Нанодиагностика», Россия), который был оборудован источником света AvaLight DHc (Avantes, Нидерланды) и спектрофотометром AvaSpec (Avantes, Нидерланды), и начинали регистрировать кинетические

кривые. Через некоторое время включали генератор магнитного поля и продолжали регистрацию кинетической кривой еще в течение примерно двух минут, после чего отключали генератор магнитного поля, продолжая регистрировать кривые. Кинетические кривые регистрировали при 25°C, используя систему термостатирования, встроенную в генератор МП.

2.2.6. ИК-СПЕКТРОСКОПИЯ

2.2.6.1. РЕГИСТРАЦИЯ ИК-СПЕКТРОВ

ИК-спектры регистрировали с помощью ИК-Фурье спектрометра Tensor 27 (Bruker, Германия), оснащенного Hg-Cd-Te детектором с жидкостным охлаждением. Измерения выполняли в термостатируемой ячейке BioATR II с ZnSe элементом полного внутреннего отражения (Bruker, Германия) при 22°C. В ходе регистрации спектров ячейку спектрометра продували постоянным потоком осушенного воздуха. Образцы (~30 мкл) помещали на кристаллический элемент и регистрировали спектры три раза в диапазоне волновых чисел 4000-950 см⁻¹ с шагом 1 см⁻¹. Для регистрации каждого спектра усредняли значение 70 считываний. Базовую линию регистрировали аналогично. Обработку спектров производили в программе Opus 7.0 (Bruker, Германия).

2.2.6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ХТ

Для определения элементов вторичной структуры нативного ХТ и ХТ в составе агрегатов МНЧ-ЛК-ХТ и МНЧ-ЦА-ХТ (сконцентрированы в 20 раз после синтеза) изучали область поглощения Амид I, которую раскладывали на составляющие. Положение максимума составляющей определяли с помощью второй производной для экспериментального спектра. Процесс разложения экспериментального спектра на составляющие выполняли с помощью алгоритма Левенберга-Макрвардта, а их вид имел форму кривой Лоренца. Число компонент минимизировали так, чтобы разница между площадью экспериментального спектра и суммой площадей компонент была менее 5%. Долю элементов вторичной структуры определяли, соотнося положение компонент с литературными данными [227].

2.2.7. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ ХТ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАСТЯГИВАЮЩИХ СИЛ

Для изучения поведения ХТ под действием растягивающих сил использовали метод управляемой молекулярной динамики (программный пакет VMD/NAMD). Структура молекулы фермента (код PDB 1ACB) состояла из трех цепей, N- и C- концы которых были заряжены положительно и отрицательно, а между соответствующими остатками цистеинов были установлены дисульфидные связи. Молекула фермента была окружена слоем воды, толщина которого превосходила максимальный радиус молекулы фермента на 10 Å. В образовавшуюся

каплю были добавлены противоионы для нейтрализации заряда капли. Для того чтобы добавленные молекулы воды и противоионы не покидали каплю в процессе моделирования, к ним прикладывали специального вида удерживающий потенциал. Затем система была подвергнута процедуре приведения в равновесие, состоящей из 2000 шагов энергетической минимизации. Для проведения симуляции использовали протокол CHARMM27.

Было проведено три симуляции одиночной молекулы белка. В первом случае к молекуле фермента не прикладывали никакое силовое воздействие. Во втором случае направленные радиально от центра молекулы ферменты силы величиной 80 пН были приложены к N_{ϵ} -атомам остатков Lys-79, 90, 107, 175 и 202. В третьем случае такие же силы были приложены к C_{δ} -атомам Glu-21, 49 и C_{β} -атомам Asp-64, 129. Конформации фермента фиксировали каждые 5 пс в течение 20 нс общей продолжительности симуляции.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. СИНТЕЗ МНЧ СО СПОСОБНОСТЬЮ К БРАУНОВКОЙ РЕЛАКАЦИИ

Успешная реализация МНМ подхода к управлению активностью ферментов подразумевает использование МНЧ, способных ковалентно иммобилизовать белки и претерпевать Брауновский механизм релаксации во внешнем НЧППП. Способность к Брауновской релаксации может быть достигнута благодаря правильно подобранным размерам и фазовому составу магнитной составляющей МНЧ. Введение золота на поверхность МНЧ позволяет функционализировать их поверхность тиол-содержащими лигандами, содержащими также амино- или карбоксильные группы, в результате чего МНЧ приобретают способность ковалентно связывать белки. В данной части работы были синтезированы МНЧ магнетит-золото типа ядро-оболочка и типа гантель и изучены их свойства на предмет способности претерпевать Брауновский механизм релаксации в НЧППП.

3.1.1. СИНТЕЗ МНЧ МАГНЕТИТ-ЗОЛОТО ТИПА ЯДРО-ОБОЛОЧКА И ГАНТЕЛЬ

На первой стадии синтеза МНЧ магнетит-золото типа ядро-оболочка были синтезированы НЧ магнитных ядер по методу соосаждения солей Fe^{2+} и Fe^{3+} , являющемуся наиболее простым и часто используемым в научной литературе [228]. Синтезированные НЧ магнитных ядер, микрофотография ПЭМ которых приведена на Рисунке 17 А, обладали сферической формой и имели средний размер 9 ± 2 нм (Рисунок 17 Б). Стоит отметить, что на Рисунке 17 А НЧ представлены в виде крупных агрегатов, что может говорить об их низкой коллоидной стабильности или агрегации при высыхании капли на сеточке для микроскопии в процессе пробоподготовки.

Поверхность НЧ магнитных ядер была покрыта оболочкой золота по методу цитратного восстановления золотохлороводородной кислоты. Введение золотой оболочки, окружающей НЧ магнитных ядер, давало возможность в дальнейшем легко функционализировать поверхность МНЧ с помощью тиол- или дисульфид-содержащих лигандов [229], повышало стабильность МНЧ, а также защищало НЧ магнитных ядер от окисления. На Рисунке 17 В представлена микрофотография ПЭМ МНЧ ядро-оболочка, из которой видно, что НЧ имели сферическую форму. Размер МНЧ ядро-оболочка был больше по сравнению с размером НЧ магнитных ядер и составил 31 ± 1 нм (Рисунок 17 Г).

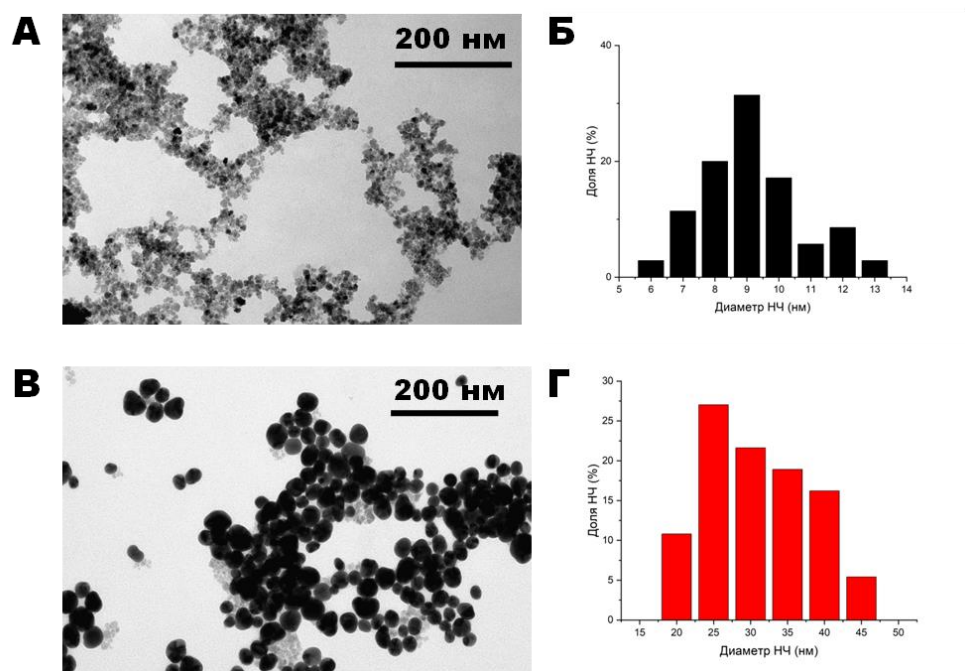


Рисунок 17. Характеризация НЧ магнитных ядер и МНЧ типа ядро-оболочка методом ПЭМ. (А, В) микрофотография ПЭМ (А) НЧ магнитных ядер и (В) МНЧ ядро-оболочка. (Б, Г) гистограмма распределений по размерам соответствующих НЧ.

ГМНЧ магнетит-золото были синтезированы по методу термического разложения пентакарбонила железа на поверхности НЧ золота, получаемых *in situ* в процессе синтеза. Размер и морфология синтезированных ГМНЧ были охарактеризованы методом ПЭМ (Рисунок 18 А). На представленных микрофотографиях можно видеть попарно соединенные на границе раздела фаз НЧ магнетита и золота, образующие так называемую гантелевидную структуру. НЧ магнетита, входящие в состав ГМНЧ, имели сферическую или слабо ограниченную форму, а их размер составил 13 ± 1 нм (Рисунок 18 Б черные столбики). Размер НЧ золота составлял $3,4 \pm 0,1$ нм (Рисунок 18 Б красные столбики).

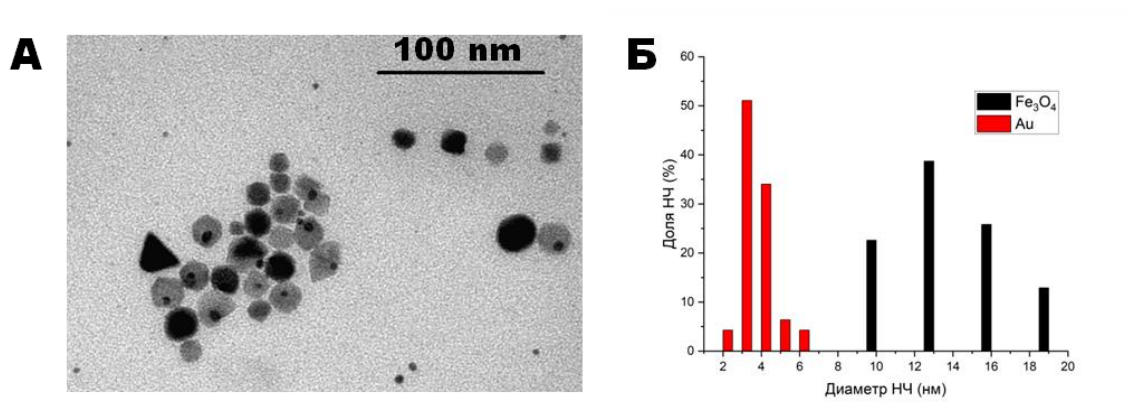


Рисунок 18. Характеризация ГМНЧ методом ПЭМ. (А) Микрофотография ПЭМ. (Б) Гистограмма распределений по размерам НЧ золота и магнетита, входящих в состав МНЧ.

3.1.2. ИЗУЧЕНИЕ ФАЗОВОГО СОСТАВА СИНТЕЗИРОВАННЫХ МНЧ МЕТОДОМ МЁССБАУЭРОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Важным вопросом, касающимся свойств синтезированных МНЧ, является их фазовый состав, поскольку именно фазовый состав, в первую очередь, определяет магнитные свойства МНЧ. Для изучения фазового состава НЧ магнитных ядер и ГМНЧ были исследованы с помощью метода Мёссбауэровской спектроскопии. Полученный экспериментальный спектр НЧ магнитных ядер, представленный на Рисунке 19, был разложен на семь секстетов и два дублета, соответствующих различным комбинациям сигналов от ядер Fe^{2+} и Fe^{3+} в тетраэдрических и октаэдрических позициях. В Таблице 2 представлены обобщенные параметры, определенные из Мёссбауэровского спектра. Характерной чертой Мёссбауэровских спектров нестехиометрического магнетита Fe_3O_4 является быстрый электронный обмен между ядрами Fe^{2+} и Fe^{3+} , находящимися в октаэдрических позициях. При этом часть ядер Fe^{3+} , не вовлеченных в такой обмен ввиду недостатка ядер Fe^{2+} , формирует спектр, неотличимый от спектра ядер Fe^{3+} в тетраэдрических позициях. Коэффициент вакансий x может быть рассчитан согласно [230, 231], как:

$$x = \frac{1,88 \frac{S_A}{S_B} - 1}{4,7 + 5,64 \frac{S_A}{S_B}} \quad (5)$$

где S_A и S_B представляют относительный Мёссбауэровский вклад ядер Fe^{3+} в тетраэдрических и октаэдрических позициях, соответственно.

По результатам обработки спектра НЧ магнитных ядер соотношение S_A/S_B составило 1,39, что, в свою очередь, дает величину коэффициента вакансии $x=0,129$. Таким образом, формулу для НЧ магнитных ядер можно записать как $\text{Fe}_{0,61}^{2+}\text{Fe}_{2,26}^{3+}\text{O}_4$, в которой доля ядер Fe^{2+} от общего количества всех ядер железа составляет 0,21. Данная величина значительно отличается от стехиометрического магнетита ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}_{\text{общ}} = 0,33$), что позволяет говорить о том, что фазовый состав синтезированных НЧ можно определить как смесь магнетит/маггемит в соотношении $\sim 2/1$.

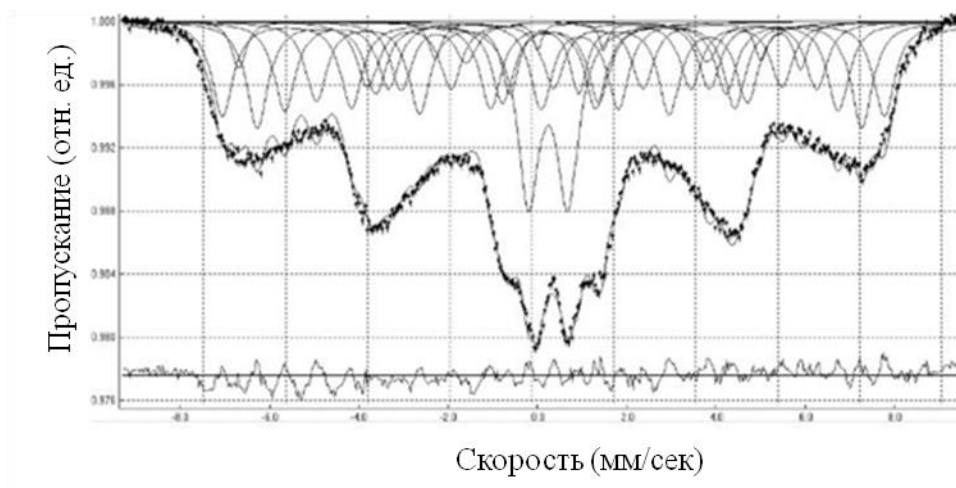


Рисунок 19. Мёссбауэровский спектр НЧ магнитных ядер. Экспериментальный спектр представлен толстой линией, модельные спектры представлены тонкими. Нижняя линия соответствует разности между экспериментальным и модельным спектрами. $T = 300$ К.

Таблица 2. Результаты обработки Мёссбауэровского спектра НЧ магнитных ядер и ГМНЧ.

Синтезированные МНЧ	Общая площадь ядер Fe^{3+} в тетраэдрических позициях S_A , %	Общая площадь ядер Fe^{3+} в октаэдрических позициях S_B , %	S_A/S_B	Коэффициент вакансий x	$Fe^{2+}/Fe_{общ}$
Магнитные ядра	50.88	36.50	1,39	0,129	0,21
ГМНЧ	39,9	60,1	0,66	0,03	0,31

Для ГМНЧ фазовый состав был определен ранее [221]. По результатам обработки спектра было получено соотношение $S_A/S_B = 0,66$ (Таблица 2). Это, в свою очередь, дает величину формульного коэффициента вакансий $x = 0,03$, а доля ядер Fe^{2+} от всех ядер железа составила 0,31. Данная величина всего на 0,02 отличается от стехиометрического магнетита ($Fe^{2+}/Fe_{общ} = 0,33$). Таким образом, можно сказать, что магнитная часть в ГМНЧ представлена фазой чистого магнетита.

3.1.3. ВЫЧИСЛЕНИЕ КРИТИЧЕСКОГО РАДИУСА, ОПРЕДЕЛЯЮЩЕГО МЕХАНИЗМ РЕЛАКСАЦИИ МНЧ МАГНЕТИТА И МАГГЕМИТА

Размер МНЧ, как и их магнитные свойства, определяет, по какому механизму будет происходить процесс релаксации во внешнем МП. Так, МНЧ сравнительно небольшого размера будут релаксировать по Неелевскому механизму, в то время как более крупные по Брауновскому (см. главу 1.2). Смена одного механизма на другой будет происходить при некоторой величине критического радиуса МНЧ R_C , которая зависит от материала, вязкости

среды, температуры и размера НЧ. В литературе [206] представлены данные о том, что для магнетита $R_C \approx 7$ нм. Используя для расчета значения эффективных констант магнитной анизотропии K_{eff} для НЧ, которые наиболее близко подходят к синтезированным нами МНЧ, нами уточнено значение R_C для магнетита, а также рассчитано значение R_C для маггемита в водном растворе при комнатной температуре. Так, значение R_C составило $\sim 4,1$ и $\sim 5,9$ нм для магнетита и маггемита, соответственно (Рисунок 20). Для расчетов использовали значения эффективных констант магнитной анизотропии K_{eff} для НЧ магнетита и маггемита диаметром 10 нм [232, 233] (для справки, диаметр синтезированных нами магнитной части в НЧ магнитных ядер и ГМНЧ составлял 9 и 13 нм, соответственно). Для расчета R_C использовали методику, которая не учитывает зависимость K_{eff} от размера МНЧ [207]. Стоит отметить, что при уменьшении размеров МНЧ, значение K_{eff} увеличивается, что должно приводить к более резкому росту τ_N и, соответственно, снижению значений R . Таким образом, рассчитанные нами значения R_C являются его верхней оценкой. Стоит отметить, что в расчете также не учитывается вклад золотой оболочки, которая может увеличивать гидродинамический размер НЧ и, соответственно, влиять на значение τ_B . Такие изменения могут повлиять на значение R_C как в сторону его уменьшения, так и в сторону увеличения. Однако, изменение значений τ_B не должно кардинально повлиять на значение R_C , поскольку, в первую очередь, оно определяется более ярко выраженной экспоненциальной величиной τ_N .

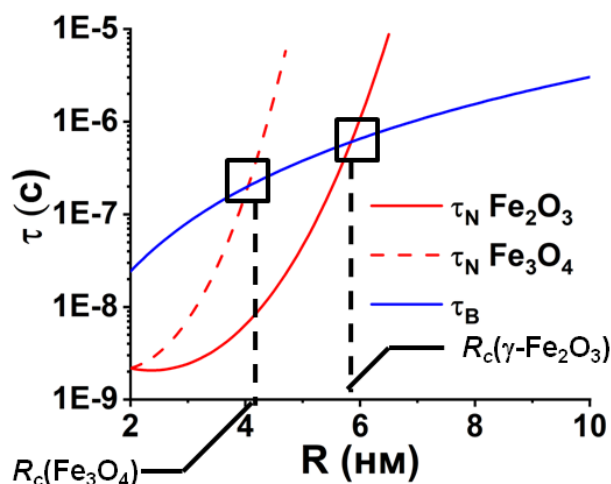


Рисунок 20. Зависимость характерных времен Неелевского (τ_N) и Брауновского (τ_B) механизмов релаксации для магнетита Fe_3O_4 и маггемита $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Черным пунктиром показан критический радиус R_C при котором происходит переход между двумя механизмами.

Учитывая размер магнитного ядра, а также его фазовый состав, мы предполагаем, что, как минимум, часть синтезированных МНЧ типа ядро-оболочка релаксируют по Брауновскому

механизму. В то же время, по-видимому, практически все ГМНЧ имеют Брауновский механизм релаксации, поскольку средний размер их магнитной части на $\sim 2,5$ нм больше, чем рассчитанное нами значение R_C для чистого магнетита. Тем не менее, учитывая гетерогенность образца, незначительная часть ГМНЧ все же может претерпевать Неелевский механизм релаксации.

3.2. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА МНЧ МАГNETИТ-ЗОЛОТО, В РЕЗУЛЬТАТЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИХ СТРУКТУРЫ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НЧПМП

Как было рассмотрено в обзоре литературы (см. главу 1.2), воздействие НЧПМП может приводить к инактивации ферментов, которая, предположительно, обусловлена механическим воздействием со стороны МНЧ, на поверхности которых был иммобилизован фермент. Однако, экспериментально природа данного явления доказана не была. Согласно модели, Брауновская релаксация МНЧ в НЧПМП приводит к генерации сил, приложенных к молекулам на поверхности МНЧ, природа и величина которых зависит от структуры агрегата МНЧ с ферментом («димер» или «мономер»). Так, для «димерного» агрегата (т.е. агрегата, в котором молекулы фермента связаны одновременно с несколькими МНЧ) воздействие НЧПМП приводит к генерации «контактных» сил, которые растягивают, сдавливают, скручивают и сдвигают иммобилизованный фермент, а величины этих сил достигают сотен пН [201]. Для «мономерного» агрегата (т.е. агрегата, в котором молекулы фермента связаны одновременно только с одной МНЧ) воздействие НЧПМП приводит к генерации гидродинамических сил, приложенных к молекулам фермента, величины которых не превышают единиц пН [234]. Предполагается, что «контактные» силы способны повлиять на структуру фермента и его активность, в то время как влияние гидродинамических сил может оказаться недостаточным для подобного эффекта. Поэтому в данной части работы проводилась разработка и оптимизация именно «димерных» агрегатов МНЧ с ферментом (агрегатов типа МНЧ-фермент-МНЧ), позволяющих регулировать активность ферментов, иммобилизованных на МНЧ ядро-оболочка, в результате изменения их структуры под воздействием НЧПМП. Для таких агрегатов была показана частичная инактивация на примере двух ферментов (ХТ, АДГ), а также доказана магнито-наномеханическая природа такой инактивации и выявлен ее молекулярный механизм (для ХТ).

3.2.1. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ИНАКТИВАЦИИ ХТ В АГРЕГАТЕ ТИПА МНЧ-ХТ-МНЧ («ДИМЕР») ПОД ДЕЙСТВИЕМ НЧПМП

3.2.1.1. ПОЛУЧЕНИЕ АГРЕГАТОВ ТИПА МНЧ-ХТ-МНЧ С РАЗЛИЧНОЙ МОДИФИКАЦИЕЙ ГРУПП ФЕРМЕНТА

Схема получения агрегатов типа МНЧ-ХТ-МНЧ с различной модификацией групп фермента представлена на Рисунке 21. На первом этапе МНЧ типа ядро-оболочка были функционализированы двумя типами серосодержащих лигандов, липоевой кислотой (МНЧ-ЛК) и цистамином (МНЧ-ЦА), содержащих карбоксильные и аминогруппы, соответственно (Рисунок 21 А, Б). Поверхность функционализированных МНЧ была заряжена отрицательно: ζ -потенциал составил (-30 ± 7) и (-15 ± 1) мВ для МНЧ-ЛК и МНЧ-ЦА, соответственно (Рисунок 22 А, Б). Отрицательный заряд МНЧ-ЦА, содержащих аминогруппы, по всей видимости, объясняется наличием цитрат ионов, которые стабилизировали нефункционализированные МНЧ. МНЧ-ЛК и МНЧ-ЦА были стабильны при длительном хранении, что подтверждается результатами НТА (Рисунок 22 В, Г).

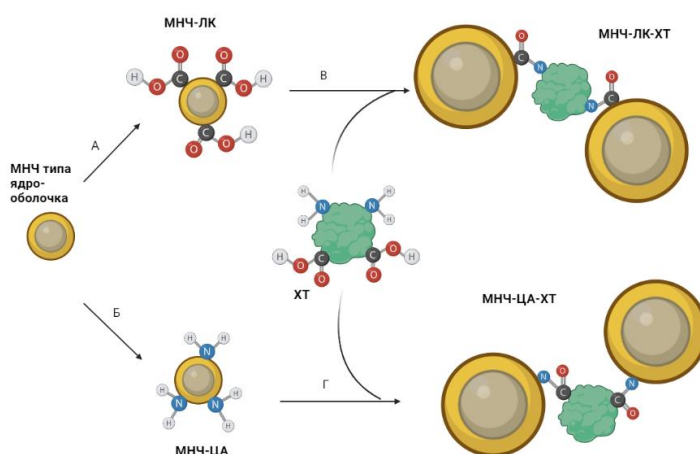


Рисунок 21. Схема получения агрегатов типа МНЧ-ХТ-МНЧ. В результате функционализации поверхности МНЧ типа ядро-оболочка (А) липоевой кислотой или (Б) цистамином были получены образцы МНЧ-ЛК и МНЧ-ЦА, соответственно. (В) Поверхностные карбоксильные группы МНЧ-ЛК конъюгировали с ϵ -аминогруппами остатков лизина на поверхности ХТ с образованием МНЧ-ЛК-ХТ. (Г) Поверхностные аминогруппы МНЧ-ЦА конъюгировали с карбоксильными группами остатков аспартата и глутамата на поверхности ХТ с образованием МНЧ-ЦА-ХТ. В обоих случаях реакцию конъюгации проводили *in situ* с использованием EDC/S-NHS. Схема представлена в упрощенном виде и не учитывает соотношение размеров МНЧ и белковой глобулы, гетерогенность МНЧ, образование агрегатов белка, а также возможность образования различных структур, таких как агрегат, состоящий более чем из двух МНЧ.

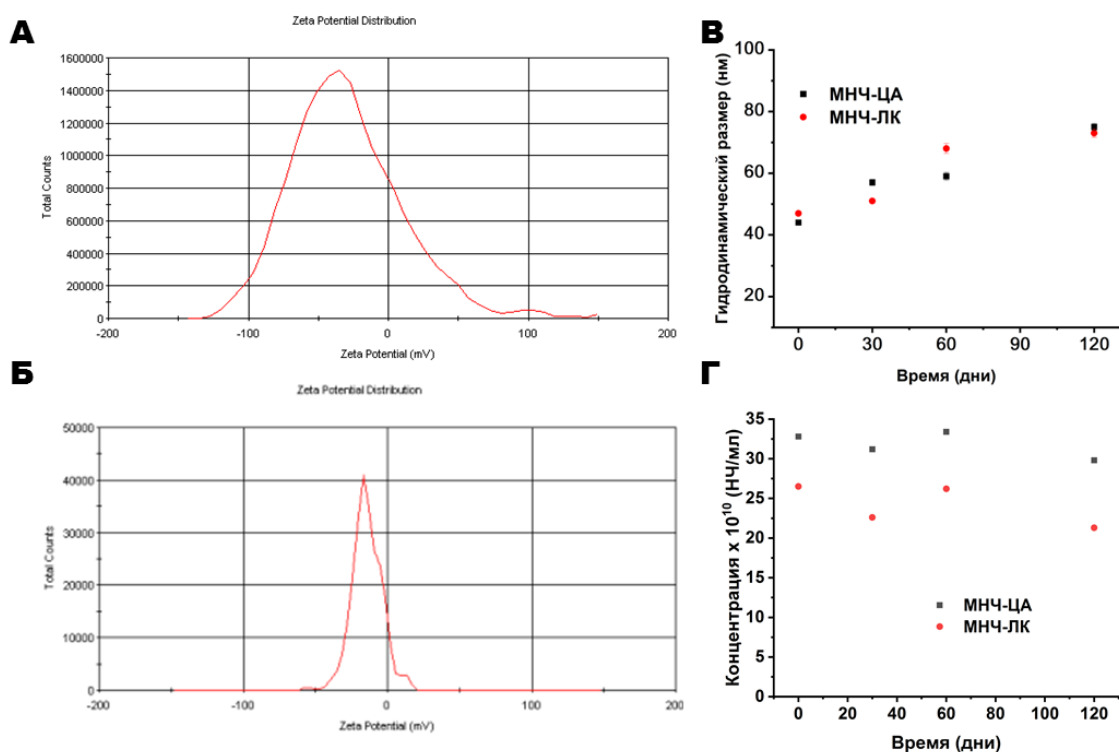


Рисунок 22. Характеризация образцов МНЧ-ЛК и МНЧ-ЦА методами (А, Б) DLS и (В, Г) NTA. ζ -потенциал (А) МНЧ-ЛК и (Б) МНЧ-ЦА. (В, Г) Изменение (В) гидродинамического размера и (Г) концентрации НЧ во времени.

Для связывания ХТ с поверхностью функционализированных МНЧ использовали карбодиимидный метод. Данный метод позволяет связывать поверхностные карбоксильные и аминогруппы фермента и носителя за счет образования активного эфира карбоксильной группы, который затем атакует аминогруппу. В случае МНЧ-ЛК карбоксильные группы на поверхности МНЧ образовывали амидную связь с доступными ϵ -аминогруппами остатков лизина на поверхности белка (Рисунок 21 В). В случае МНЧ-ЦА аминогруппы на поверхности МНЧ образовывали амидные связи с карбоксильными группами остатков аспартата и глутамата на поверхности фермента (Рисунок 21 Г). Связывания белка с МНЧ проводили в одну стадию с активацией карбоксильных групп с помощью EDC/S-NHS *in situ*, которые затем реагировали с аминогруппами. Таким образом, были синтезированы агрегаты типа МНЧ-ХТ-МНЧ двух типов, в которых либо амино- (МНЧ-ЛК-ХТ), либо карбоксильные группы фермента (МНЧ-ЦА-ХТ) образовывали амидную связь с поверхностью МНЧ.

По данным NTA в результате связывания ХТ с поверхностью обоих типов функционализированных МНЧ наблюдалось увеличение гидродинамических размеров в ~2,5-3,2 раза (Рисунок 23 А, Б, Таблица 3). Увеличение размеров МНЧ, содержащих фермент, по сравнению с немодифицированными МНЧ может говорить об образовании агрегата, состоящего из нескольких МНЧ, связанных между собой молекулами ХТ. Данное

предположение также было подтверждено с помощью анализа микрофотографий ПЭМ (Рисунок 24), на которых наблюдалось увеличение доли агрегатов НЧ после связывания белка.

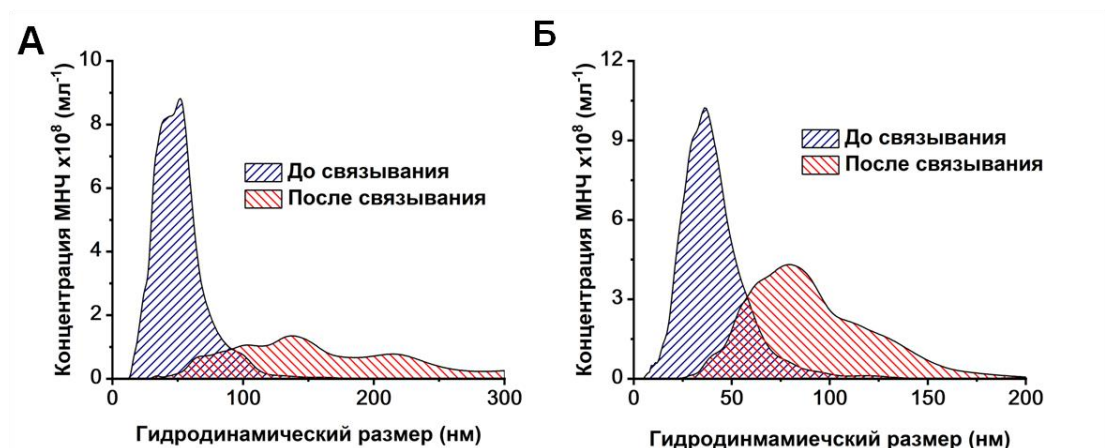


Рисунок 23. Зависимость концентрации МНЧ, функционализированных (А) липоевой кислотой и (Б) цистамином, от гидродинамического размера до и после связывания с ХТ.

Таблица 3. Средний гидродинамический размер функционализированных МНЧ до и после связывания с ХТ. Данные получены на основе Рисунка 23.

	МНЧ-ЛК	МНЧ-ЛК-ХТ	МНЧ-ЦА	МНЧ-ЦА-ХТ
Средний размер, нм	53 ± 1	171 ± 4	44 ± 1	113 ± 2

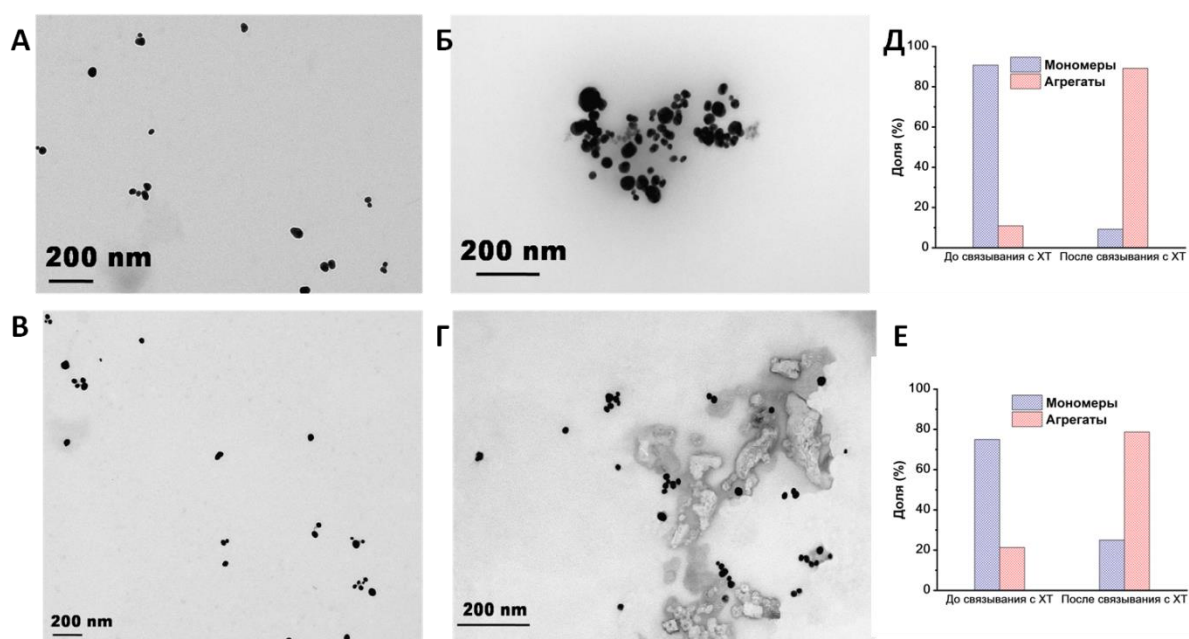


Рисунок 24. Характеризация МНЧ до и после связывания с ХТ методом ПЭМ. Микрофотографии ПЭМ (А) МНЧ-ЛК, (Б) МНЧ-ЛК-ХТ, (В) МНЧ-ЦА, (Г) МНЧ-ЦА-ХТ. Изменение доли мономеров и агрегатов МНЧ до и после связывания с ХТ на поверхности (Д) МНЧ-ЛК и (Е) МНЧ-ЦА.

3.2.1.2. ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ВО ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЕ ХТ В АГРЕГАТЕ ТИПА МНЧ-ХТ-МНЧ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НЧПМП

Для изучения изменений во вторичной структуре ХТ использовали метод ИК-Фурье спектроскопии в режиме нарушенного полного внутреннего отражения. Характер областей Амид I и II позволяет получить общую информацию о колебаниях пептидных связей. На Рисунке 25 представлены области поглощения Амид I и Амид II спектров нативного ХТ, а также двух агрегатов типа МНЧ-ХТ-МНЧ до, сразу после и через 3 часа после воздействия трех циклов «пульсирующего» НЧПМП ($f = 50$ Гц, $B = 140$ мТл, Пульс/пауза = 1 мин/30 с). Так, НЧПМП не приводило к изменению характера спектра нативного ХТ (Рисунок 25 А). В то же время воздействие НЧПМП приводило к существенным изменениям в характере спектров ХТ в составе агрегатов (Рисунок 25 Б, В; сравни черные и красные линии). Через 3 часа после воздействия НЧПМП характер спектра (положение точек перегиба) для образца МНЧ-ЛК-ХТ практически полностью возвращался к исходным значениям (до воздействия НЧПМП) (Рисунок 25 Б; сравни черные и голубые линии), в то время как для образца МНЧ-ЦА-ХТ такое восстановление было неполным (Рисунок 25; В сравни черные и голубые линии)

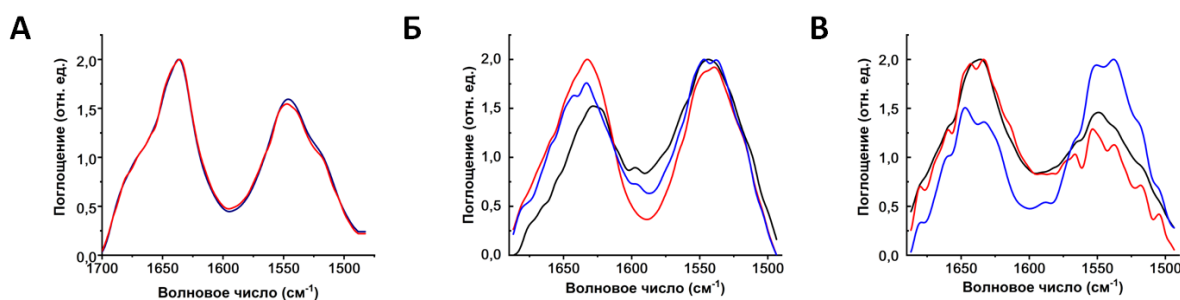


Рисунок 25. Область поглощения Амид I и Амид II в ИК-Фурье спектре (А) нативного ХТ (1 мг/мл), (Б) МНЧ-ЛК-ХТ и (В) МНЧ-ЦА-ХТ до (черная линия), сразу после (красная линия) и через 3 часа после (голубая линия) воздействия трех циклов «пульсирующего» НЧПМП ($f = 50$ Гц, $B = 140$ мТл, Пульс/Пауза = 1 мин/30 с). Спектры нормализованы. Образцы, содержащие агрегаты МНЧ с ХТ, были сконцентрированы в 20 раз после синтеза.

Для получения информации о содержании элементов вторичной структуры ХТ (α -спиралей, β - и неупорядоченных структур), проводили деконволюцию спектральной области Амид I и сравнивали положение второй производной с литературными данными для нативного ХТ [227, 235]. Подробные данные о деконволюции представлены в приложении. Возможное содержание агрегатов белка в конъюгатах достоверно определить не удалось, поэтому в деконволюционном анализе содержание агрегатов белка не учитывалось. В Таблице 4 представлено содержание элементов вторичной структуры для нативного ХТ и ХТ в образце

МНЧ-ЛК-ХТ и МНЧ-ЦА-ХТ до, сразу после и через 3 часа после воздействия НЧПМП, полученное на основе ИК-Фурье спектров. Так, содержание элементов вторичной структуры нативного ХТ хорошо согласовывалось с данными литературы (11% α -спиралей, 55% β -структур, 34% неупорядоченных структур) [236], а связывание ХТ с обоими типами функционализированных МНЧ не приводило к значительным изменениям в содержании элементов вторичной структуры. В результате воздействия НЧПМП не наблюдалось изменений в содержании элементов вторичной структуры для нативного ХТ, в то время как содержание элементов вторичной структуры ХТ в агрегатах с МНЧ значительно изменялось. Так, для двух типов агрегатов (МНЧ-ЛК-ХТ и МНЧ-ЦА-ХТ) сразу после действия НЧПМП наблюдалось практически полное исчезновение α -спиралей. Эти изменения были обратимыми, и через 3 часа после воздействия НЧПМП их содержание полностью восстанавливалось. β -структуры под воздействием НЧПМП для различных агрегатов ХТ с МНЧ вели себя по-разному. Так, доля β -структур в МНЧ-ЦА-ХТ необратимо снижалась с 54% до 40%, в то время как воздействие НЧПМП не приводило к существенным изменениям в содержании β -структур МНЧ-ЛК-ХТ. Доля неупорядоченных элементов возрастала с 41% до 47% и с 34% до 57% для МНЧ-ЛК-ХТ и МНЧ-ЦА-ХТ, соответственно. Эти изменения носили обратимый характер и через 3 часа после воздействия НЧПМП доля неупорядоченных структур полностью или частично восстанавливалась до исходных значений.

Таким образом, можно говорить о том, что в результате воздействия НЧПМП на ХТ в составе агрегатов типа МНЧ-ХТ-МНЧ наблюдались значительные изменения во вторичной структуре белка. Изменения во вторичной структуре были более значимы для ХТ в составе образца МНЧ-ЦА-ХТ, чем для МНЧ-ЛК-ХТ. Наблюдаемые изменения носили обратимый, либо частично обратимый характер. Характерные времена релаксации ферментов могут зависеть от различных факторов, таких как количество аминокислотных остатков в полипептидной цепи, молекулярная масса и характера вторичной структуры [237, 238]. Так, например, сворачивание α -спиралей происходит быстрее, чем сворачивание β -структур или неупорядоченных структур [238]. В литературе представлены данные о времени сворачивания химотрипсиногена, неактивного предшественника ХТ, в структуре которого расщепляются дисульфидные связи в восстанавливающей среде, которое составило 3 часа [239]. В соответствии с вышесказанным, нами наблюдалось полное восстановление доли α -спиралей и полное или частичное восстановление β -структур и неупорядоченных структур в течение трех часов после воздействия НЧПМП на конъюгаты.

Таблица 4 Содержание элементов вторичной структуры в нативном ХТ и ХТ в образцах МНЧ-ЛК-ХТ и МНЧ-ЦА-ХТ до, сразу после и через 3 часа после воздействия трех циклов «пульсирующего» НЧПМП ($f = 50$ Гц, $B = 140$ мТл, Пульс/Пауза = 1 мин/30 с).

Элементы вторичной структуры	Воздействие	Нативный ХТ	МНЧ-ЛК-ХТ	МНЧ-ЦА-ХТ
α -спирали, %	До НЧПМП	10	10	12
	Сразу после НЧПМП	13	2	3
	Через 3 часа после НЧПМП		11	12
β -структуры, %	До НЧПМП	53	49	54
	Сразу после НЧПМП	59	51	40
	Через 3 часа после НЧПМП		49	42
Неупорядоченные структуры, %	До НЧПМП	37	41	34
	Сразу после НЧПМП	28	47	57
	Через 3 часа после НЧПМП		40	46

3.2.1.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ ХТ

Для определения концентрации активных центров ХТ использовали реакцию гидролиза субстрата ПНФТМА. За кинетикой реакции следили спектрофотометрически, наблюдая за резким выбросом окрашенного продукта реакции – пара-нитрофенола – при длине волны 400 нм. Концентрацию активных центров фермента E_0 определяли, экстраполируя стационарный участок кинетической кривой к нулевому времени [240] (Рисунок 26). Значение E_0 для нативного (несвязанного с МНЧ ХТ) составило 3 мкМ, что равнялось 40% от концентрации фермента, определенной по навеске. Нам не удалось достоверно определить концентрацию активных центров ХТ в составе агрегатов типа МНЧ-ХТ-МНЧ из-за того, что его концентрация была слишком мала для достоверного титрования.

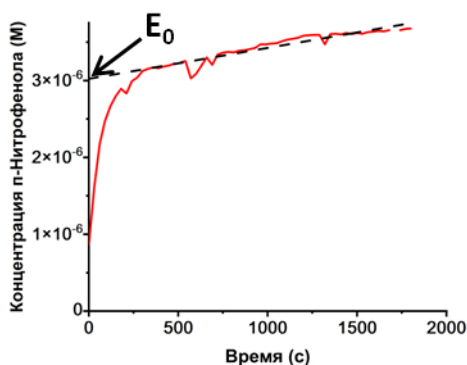


Рисунок 26. Кинетическая кривая образования пара-нитрофенола в реакции гидролиза ПНФТМА под действием нативного ХТ (7,5 мкМ). Концентрация субстрата 6 мкМ, 20 мМ ТРИС-буфер (рН 8,2), 1% (об.) ацетонитрил, 25°C, $\epsilon = 18500 \text{ (M} \cdot \text{cm)}^{-1}$. Черным пунктиром показан экстраполяция стационарного участка кривой к нулевому времени, соответствующая концентрации активных центров фермента E_0 .

3.2.1.4. ВЛИЯНИЕ НЧПМП НА КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ХТ В СОСТАВЕ АГРЕГАТОВ ТИПА МНЧ-ХТ-МНЧ

Влияние «пульсирующего» НЧПМП на кинетические параметры ХТ изучалось спектрофотометрически по реакции гидролиза субстрата NSAAPFpNA. Ранее было показано, что применение «пульсирующего» режима воздействия НЧПМП позволяет повысить влияние НЧПМП на активность иммобилизованного фермента [200, 208, 220]. Ферментативную реакцию регистрировали после воздействия НЧПМП на ХТ, так называемый «постэффект». Из Рисунка 27 А видно, что результате воздействия НЧПМП на ХТ в агрегате типа МНЧ-ХТ-МНЧ наблюдалось уменьшение значений начальной скорости реакции V . Стоит отметить, что в данной работе пренебрегали гидролизом субстрата в отсутствие фермента, поскольку он был незначительным. Эффект снижения активности ХТ под воздействием НЧПМП был обратимым, и спустя 3 часа после воздействия активность ХТ практически полностью восстанавливалась (Рисунок 27 Б). Восстановление активности во времени можно объяснить релаксационными процессами, аналогичными тем, что происходят в молекулах полимеров после механической деформации с последующим снятием нагрузки [241]. Подобное явление наблюдалось ранее экспериментально для ферментов под воздействием различных механических стимулов [145, 198, 199].

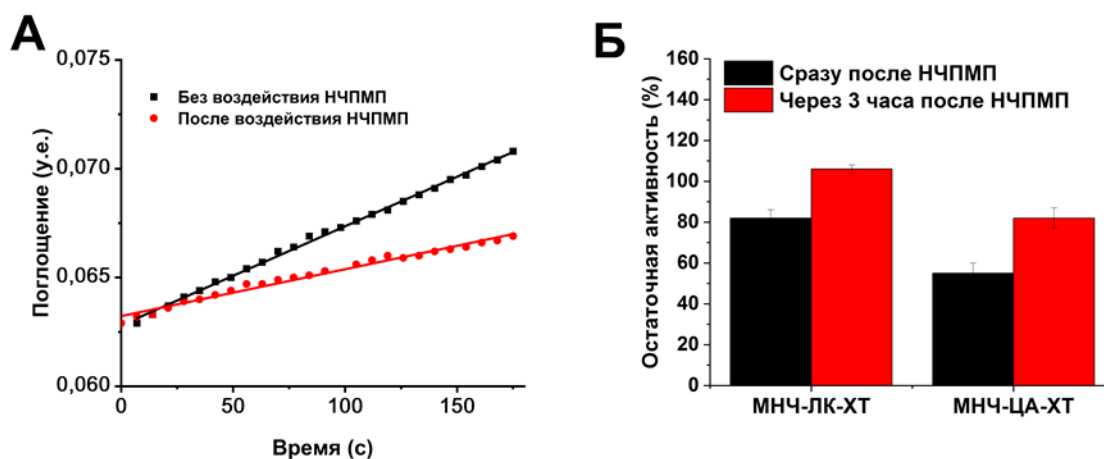


Рисунок 27. (А) Влияние трех циклов «пульсирующего» НЧПМП ($f = 50$ Гц, $B = 140$ мТл, Пульс/Пауза = 1 мин/30 с) на ферментативную активность ХТ в агрегатах МНЧ-ЛК-ХТ и МНЧ-ЦА-ХТ. (А) Кинетические кривые реакции гидролиза субстрата NSAAPFpNA (7,5 мкМ) под действием МНЧ-ЦА-ХТ. (Б) Изменение остаточной активности ХТ через 3 часа после воздействия НЧПМП. 20 мМ ТРИС-буфер (рН = 8,2), 0,5% (об.) ацетонитрил, 0,5% (об.) 1,4-диоксан, 25°C.

На Рисунке 28 показана зависимость значений V от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка для нативного ХТ и ХТ в составе агрегатов типа МНЧ-ХТ-МНЧ. Так, из Рисунка 28 А видно, что влияние НЧПМП не приводило к изменению значений V для нативного ХТ. В то же время НЧПМП приводило к снижению значений V для ХТ в составе агрегатов, которые наиболее ярко проявлялись при низких концентрациях субстрата (Рисунок 28 Б, В)

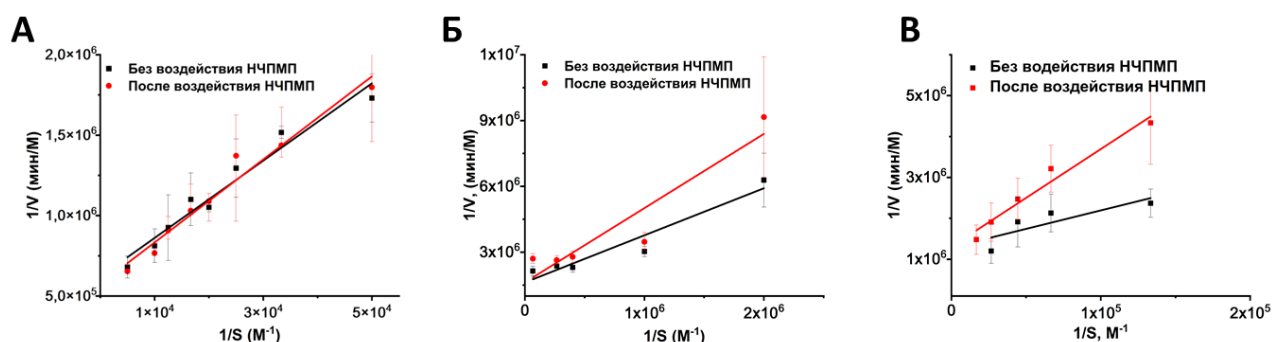


Рисунок 28. Влияние трех циклов «пульсирующего» НЧПМП ($f = 50$ Гц, $B = 140$ мТл, Пульс/Пауза = 1 мин/30 с) на зависимость начальных скоростей V реакции гидролиза NSAAPFpNA под действием (А) нативного ХТ и ХТ в агрегатах (Б) МНЧ-ЛК-ХТ и (В) МНЧ-ЦА-ХТ от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка. 20 мМ ТРИС-буфер (рН = 8,2), 0,5% (об.) ацетонитрил, 0,5% (об.) 1,4-диоксан, 25°C.

На основании данных Рисунка 28 для нативного ХТ и ХТ в составе агрегатов типа МНЧ-ХТ-МНЧ были рассчитаны значения K_M и V_M , которые представлены в Таблице 5. Как видно из таблицы, в случае нативного ХТ значение K_M было близко к значению, представленному в литературе (43 мкМ) [242]. Однако значение $k_{cat} = (2900 \pm 200) \text{ мин}^{-1}$ (которое было определено как $k_{cat} = V_M/E_0$) было примерно на 40% выше, чем представленное в литературе (2100 мин^{-1}) [242], что все еще является хорошо согласуемым с литературой, учитывая погрешность в определении концентрации активных центров. Связывание ХТ на поверхности МНЧ приводило к снижению значений K_M в ~ 30 и ~ 6 раз для МНЧ-ЛК-ХТ и МНЧ-ЦА-ХТ, соответственно. Такое изменение K_M может означать кажущееся улучшение связывания субстрата с ферментом, иммобилизованным на МНЧ. Схожий эффект ранее был отмечен в литературе при иммобилизации различных ферментов на поверхности золотых НЧ. Так, в результате сорбции липазы на поверхности золотых НЧ наблюдалось снижение значений K_M в 2,6 раза (при неизменном значении V_{Max}) [243]. В другой работе сообщалось как об увеличении (до 4,4 раза), так и о снижении (до 2,8 раз) значений K_M для ХТ, адсорбированного на поверхности НЧ золота, функционализированных глутаминовой кислотой [244]. Было показано, что величина и характер таких изменений зависели от электростатических взаимодействий между субстратом и поверхностью НЧ. В то же время наблюдалось как снижение (до 24 раз), так и увеличение (до 3,7 раз) значений k_{cat} , в зависимости от заряда субстрата. Наконец, снижение значений K_M в 1,5 раза и V_{Max} в 5,7 раз наблюдалось для глюкозооксидазы, ковалентно связанной с золотыми НЧ, покрытыми меркаптоундекановой кислотой [245]. В нашем случае поверхность МНЧ была функционализирована двумя разными органическими молекулами, одна из которых содержит 5 CH_2 -групп (МНЧ-ЛК), а другая две (МНЧ-ЦА). Поскольку конформационных изменений в результате связывания ХТ на поверхности МНЧ практически не наблюдалось (см. главу 3.2.1.2), можно предположить, что гидрофобные взаимодействия между гидрофобным участком субстрата и группами на поверхности МНЧ приводили к концентрированию субстрата вблизи поверхности. Этот вывод согласуется со значительно более низким значением K_M для МНЧ-ЛК-ХТ, который является следствием того, что длина линкера функционализированных МНЧ была выше, по сравнению с МНЧ-ЦА-ХТ.

Таблица 5 Влияние трех циклов «пульсирующего» НЧППП ($f = 50$ Гц, $B = 140$ мТл, Пульс/Пауза = 1 мин/30 с) на кинетические параметры нативного ХТ и ХТ в агрегатах МНЧ-ЛК-ХТ и МНЧ-ЦА-ХТ (на основании Рисунка 28).

Название образца	K_M , мкМ		V_M , мкМ/мин	
	Без воздействия НЧППП	После воздействия НЧППП	Без воздействия НЧППП	После воздействия НЧППП
Нативный ХТ	39 ± 5	45 ± 5	$1,6 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$
МНЧ-ЛК-ХТ	$1,3 \pm 1,0$	$2,1 \pm 1,4$	$0,6 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,3$
МНЧ-ЦА-ХТ	7 ± 4	18 ± 3	$0,8 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$

Как видно из Таблицы 5, воздействие НЧППП не приводило к изменению кинетических параметров нативного ХТ. Также воздействие НЧППП не приводило к изменению V_M для ХТ в агрегатах. В то же время наблюдалось увеличение значений K_M в $\sim 2,5$ раза для МНЧ-ЦА-ХТ, в то время как для МНЧ-ЛК-ХТ увеличение значения K_M было менее выраженным. Таким образом, было показано, что в результате воздействия НЧППП на ХТ в агрегатах двух типов наблюдается снижение каталитической активности, обусловленное увеличением значений константы Михаэлиса, то есть ухудшением связывания субстрата в активном центре фермента. Отсутствие изменений в значениях V_M говорит о том, что воздействие НЧППП, скорее всего, не затрагивало каталитический участок активного центра фермента.

Стоит отметить, что данные об изменении элементов вторичной структуры и кинетических параметров ХТ в агрегатах типа МНЧ-ХТ-МНЧ хорошо согласуются между собой. Наблюдаемые нами эффекты были обратимы: через 3 часа после воздействия НЧППП как содержание элементов вторичной структуры, так и активность ХТ в агрегатах полностью или частично восстанавливалась для МНЧ-ЛК-ХТ и МНЧ-ЦА-ХТ, соответственно. Следует отметить, что изменения как элементов вторичной структуры, так и кинетических параметров ХТ в агрегатах, были более значимы для МНЧ-ЦА-ХТ, чем для МНЧ-ЛК-ХТ. Мы считаем, что, инактивация фермента в агрегатах МНЧ-ЛК-ХТ и МНЧ-ЦА-ХТ является следствием наблюдаемых изменений во вторичной структуре, вызванных силами, создаваемыми вращательно-колебательными движениями МНЧ в НЧППП.

В литературе представлены данные о влиянии силовых воздействий, приложенных к белковой глобуле, на активность фермента [198, 246]. В этих случаях источником силы выступал магнитный пинцет, а за активностью фермента следили с помощью флуоресцентной микроскопии. Было показано, что такое силовое воздействие приводило к снижению активности фермента за счет разрушения конформации сайта связывания субстрата, а изменения носили обратимый характер. Представленные литературные данные соответствуют нашим экспериментальным данным для ХТ в составе агрегатов типа МНЧ-ХТ-МНЧ под действием НЧППП и могут быть объяснены большей подвижностью той области ферментативной глобулы, которая отвечает за связывание субстрата [247, 248]. Такая подвижность необходима для обеспечения широкой субстратной специфичности по отношению к структурно различным соединениям [249].

3.2.1.5. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ ХТ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ РАСТЯГИВАЮЩИХ СИЛ

Для подтверждения влияния НЧППП на эффективность связывания субстрата в активном центре ХТ, проведено компьютерное моделирование поведения ХТ под действием растягивающих сил¹. Проанализировано распределение карбоксильных и аминогрупп на поверхности молекулы ХТ, полученной из базы данных Protein Data Bank (код PDB 1ACB), доступных для связывания с МНЧ. Критерием доступности той или иной группы на поверхности ХТ служит площадь контакта с растворителем, значение которой должно быть более 50\AA^2 . Так, на поверхности молекулы ХТ все ϵ -аминогруппы остатков лизина (14 штук) экспонированы в растворитель. Однако, только 12 из этих остатков доступны для связывания с МНЧ, поскольку остатки Lys-84 и Lys-107 образуют водородные связи. Эти 12 остатков собраны в пять кластеров на поверхности молекулы ХТ. Эти 5 кластеров были выбраны для приложения сил, а именно ϵ -аминогруппы остатков Lys-79, 90, 107, 175 и 202 (Рисунок 29).

¹ Эксперимент выполнен совместно с к.ф.-м.н. Уповым И.В. (МГУ имени М.В. Ломоносова)

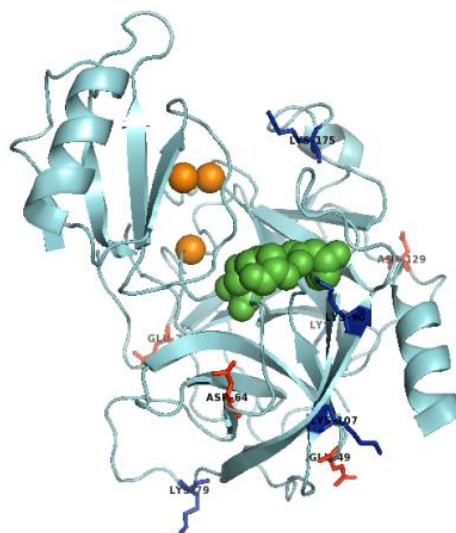


Рисунок 29. Визуализация структуры молекулы ХТ, полученной из базы данных Protein Data Bank (код PDB 1ACB). Красным и синим показаны поверхностные остатки, к которым были приложены растягивающие силы, содержащие карбоксильные и аминогруппы, соответственно. Зеленым отмечена каталитическая триада, оранжевым – остатки Cys-191, Ser-217 и 218, образующие вход в сайт связывания субстрата.

Среди карбоксильных групп на поверхности молекулы ХТ только восемь экспонированы в растворитель (Glu-20, 21, 49, Asp-64, 128, 129, 153, 178). δ -карбоксильная группа Glu-20 образует водородную связь с ОН-группой Ser-11 и не может участвовать в связывании с МНЧ. Из оставшихся семи карбоксильных групп остатки Asp-128 и 129 расположены рядом. Поэтому для компьютерного моделирования было выбрано 4 сайта на поверхности молекулы ХТ, а именно аминокислотные остатки Glu-21, 49, Asp-64, 129 (Рисунок 29).

Моделирование поведения ХТ под действием растягивающих сил проводили, используя три различных протокола: «нерастягиваемый», «амино-растягиваемый» и «карбоксильно-растягиваемый». В первом, «нерастягиваемом» протоколе, к поверхностным остаткам молекулы ХТ не прикладывали силовое воздействие. В «амино-растягиваемом» протоколе молекула ХТ подвергалась воздействию сил величиной 80 пН, радиально направленных от центра молекулы и приложенных к N_{ϵ} атомам поверхностных остатков лизина, выбранных ранее. Величина растягивающих сил в молекулярном моделировании совпадала с теоретически рассчитанной величиной сил, создаваемых МНЧ в НЧППП [206]. Наконец, «карбоксильно-растягиваемый» протокол подразумевал, что силы приложены к атомам углерода карбоксильной группы, находящимся в боковой цепи поверхностных остатков аспартата и глутамата, выбранных ранее. В обоих протоколах, в которых применялось силовое воздействие,

растягивающие силы не приводили к сдвигу молекулы ХТ от начального положения. Это достигалось благодаря правильному выбору аминокислотных остатков так, чтобы результирующий момент сил стремился к нулю. Это устранило необходимость возвращать молекулу белка к исходному положению и ориентации и упростило расчет в ходе моделирования. Длина траектории молекулярного моделирования составила 20 нс, а шаг 5 пс.

В обоих случаях приложенные внешние силы не приводили к существенному искажению глобулярной структуры ХТ и разворачиванию его полипептидных цепей. Визуальный анализ траектории свидетельствовал, что белковая глобула достаточно жесткая. Наблюдалось лишь «выпрямление» боковых цепей аминокислотных остатков, к которым были приложены внешние силы, и локальные конформационные изменения в полипептидной цепи вблизи этих остатков и в областях глобулы с неупорядоченной структурой. Наблюдаемые изменения структуры в ходе компьютерного моделирования могут быть охарактеризованы с помощью временной зависимостью отклонения структуры белка от начальной (рентгеновской) структуры (Рисунок 30). В качестве величины такого отклонения использовали стандартное отклонение (*S.D.*) «тяжелых атомов» (С, N,О) боковых цепей аминокислотных остатков:

$$S. D. = \frac{\sum_{i=1}^N d_i^2}{N}, \quad (6)$$

где d_i – расстояние между «тяжелым атомом» i боковой цепи молекулы ХТ и его положением в начальной рентгеновской структуре ХТ, N – общее число тяжелых атомов.

В соответствии с визуальным наблюдением, величина *S.D.* в растягиваемых протоколах практически не отличалась от этой величины в нерастягиваемом протоколе. Для всех трех протоколов наблюдались небольшие отклонения значений *S.D.* от исходной рентгеновской структуры, что свидетельствует о небольшом структурном дрейфе белка в ходе молекулярного моделирования. Большая часть этих отклонений происходит в первые пс моделирования, после чего данная величина колеблется в диапазоне от ~1,5 до ~1,6 Å.

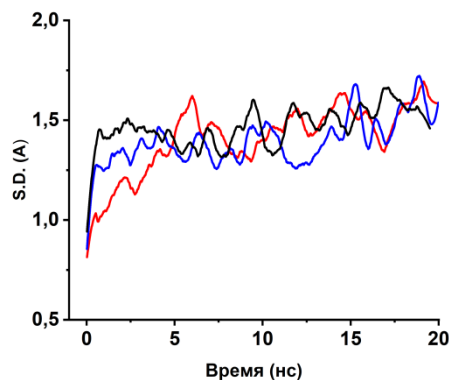


Рисунок 30. Временная зависимость стандартного отклонения (*S.D.*) «тяжелых атомов» полипептидной цепи от начальной (рентгеновской) структуры ХТ в ходе компьютерного моделирования. Внешние силы величиной 80 пН, радиально направленные от центра молекулы, были приложены к (1) N ϵ атомам Lys-79, 90, 107, 175 и 202 (обозначено красным), (2) C β атомам остатков Glu-21 и 49 и C δ -атомам остатков Asp-64 и 129 (обозначено голубым) или (3) не были приложены (обозначено черным). Начальная рентгеновская структура молекулы ХТ получена из базы данных Protein Data Base (код PDB 1ACB). Данные сглажены с помощью метода Савицкого-Голей.

Для дальнейшего анализа динамических изменений в молекуле ХТ в ходе компьютерного моделирования, которые потенциально могли бы повлиять на его функциональную активность, был проведен анализ изменений, происходящих в каталитической триаде и сайте связывания субстрата. Каталитическая триада, представленная остатками Ser-195, His-57 и Asp-102, является областью, в которой происходит превращение субстрата в продукт. Точная взаимная ориентация этих остатков в непосредственной близости друг от друга важна для эффективного катализа, а изменение ориентации остатков может привести к изменению его каталитической активности. Расстояния между парами атомов (1) His-57:N δ_1 Asp-102:O δ_2 (2) His-57:N ϵ_2 Ser-195:O γ использовали для изучения изменений, происходящих в каталитической триаде в ходе моделирования. В результате моделирования длиной 20 нс с шагом в пять пс было получено 4000 конформаций для каждого из трех протоколов. Это позволило построить функции распределения расстояний для выбранных атомов каталитической триады, представленные на Рисунке 31.

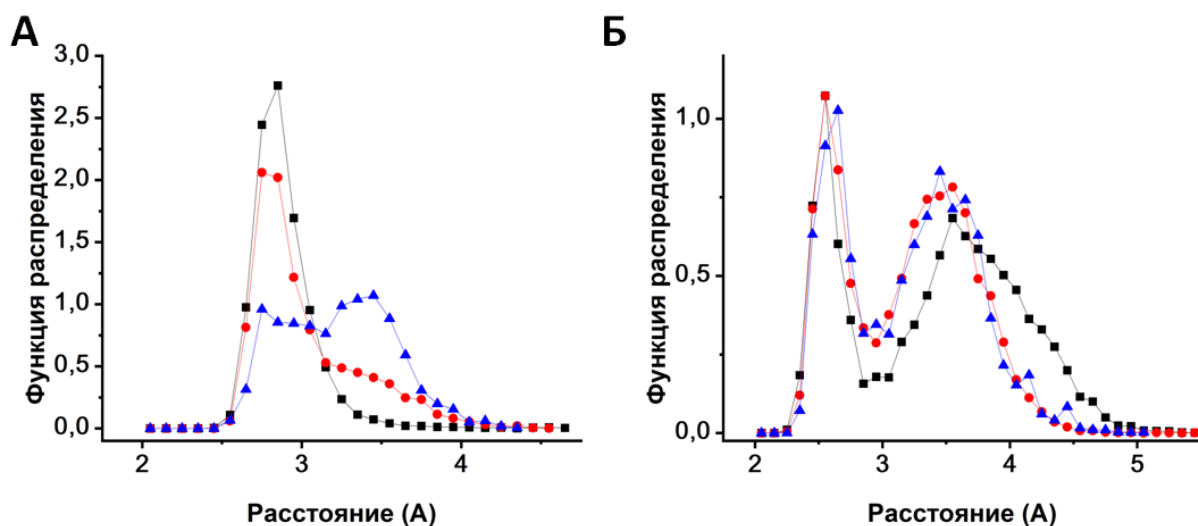


Рисунок 31. Функция распределения расстояний между парами атомов каталитической триады молекулы ХТ в ходе молекулярного моделирования: (А) His-57:N_{δ1} Asp-102:O_{δ2} (Б) His-57:N_{ε2} Ser-195:O_γ. Внешние силы величиной 80 пН приложены также, как на Рисунке 30.

Как видно из Рисунка 31 А (черная кривая) функция распределения для пары атомов His-57:N_{δ1} Asp-102:O_{δ2} демонстрирует один узкий пик в случае отсутствия приложенных сил, свидетельствующий о незначительных (~0,2-0,3 Å) колебаниях этой величины вблизи рентгеновского значения (~2,9 Å). В результате действия растягивающих сил наблюдается уширение функции распределения, особенно в случае растягиваемого за карбоксильные группы ХТ, в котором обнаруживается второй широкий пик при ~3,45 Å (Рисунок 31 А синяя кривая). Такое поведение объясняется возможностью вращения карбоксильной группы Asp-102, приводящей к уширению функции распределения и появлению второго пика. В данном случае первый и второй пики соответствуют двум конформациям, в которых водородная связь образуется между атомом His-57:N_{δ1}, с одной стороны, и атомом Asp-102:O_{δ1} или Asp-102:O_{δ2} - с другой. С точки зрения ферментативной активности прочное взаимодействие между атомом His-57:N_{δ1} и любым кислородом карбоксильной группы в этих конформациях эквивалентны. Следует отметить, что наблюдался также сдвиг положения пика к значению ~2,75 Å для растягиваемого как за амино-, так и за карбоксильные группы ХТ.

На функции распределения расстояний между парой атомов His-57:N_{ε2} Ser-195:O_γ в отсутствие внешней силы наблюдается два пика при ~2,85 и ~3,85 Å (Рисунок 31 Б). Ранее было показано, что первый пик соответствует активной конформации каталитической триады (при ~2,9 Å в рентгеновской структуре), в то время как второй пик соответствует неактивной [250]. В результате воздействия сил на молекулу ХТ наблюдались небольшие сдвиги положения пиков (Рисунок 31 Б сравни красную и синюю линии с черной). Таким образом, можно

предположить, что силовое воздействие не приводило к изменениям, которые были бы существенны для эффективного функционирования каталитической триады.

Для изучения влияния приложенных сил на сайт связывания субстрата, было проанализировано изменение расстояний между парами атомов (1) Cys-191:C α и Ser-217:C α и (2) Cys-191:C α и Ser-218:C α , расположенных вблизи входа в гидрофобный карман сайта связывания (Рисунок 29 оранжевые шарики). Данные изменения, представленные на Рисунке 32, свидетельствуют, что под действием приложенных сил расстояние между этими атомами быстро (в течение 0,2-0,3 нс) сокращалось с $\sim 8,2$ Å до ~ 5 Å для пары Cys-191:C α и Ser-217:C α и с $\sim 8,6$ Å до ~ 6 Å для пары Cys-191:C α и Ser-218:C α (Рисунок 31; сравни черную кривую с красной и синей). Отметим, что данные изменения наблюдались только для протоколов, в которых были приложены силы. Визуальный анализ полученных траекторий позволяет охарактеризовать данные изменения как «схлопывание» участка полипептидной цепи, образующего вход в гидрофобный карман. Предполагается, что это может привести к закрытию входа для субстрата, то есть повлияет на эффективность связывания.

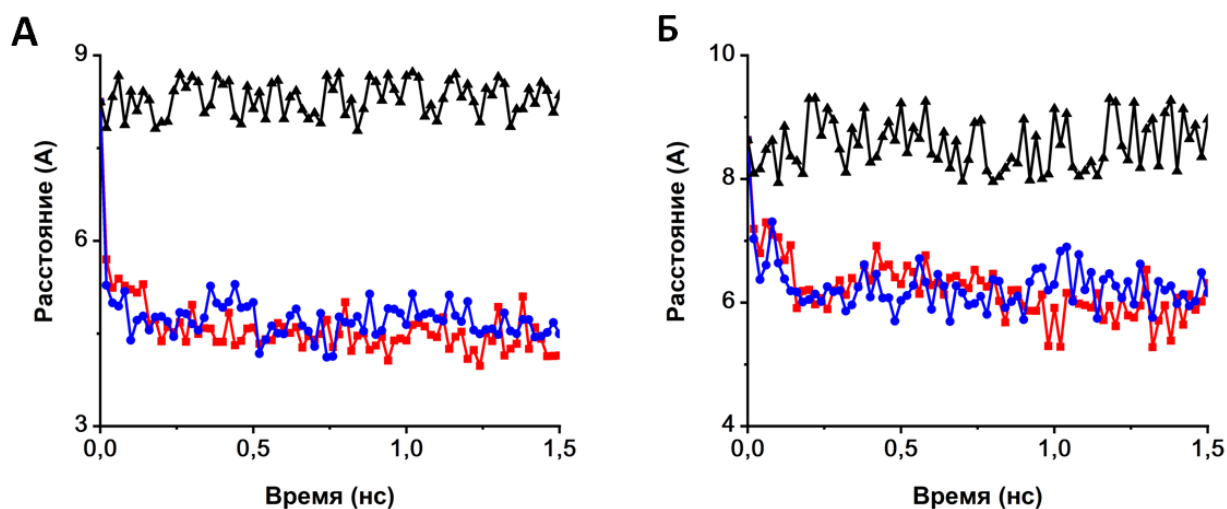


Рисунок 32. Эволюция расстояний между парами C α атомов аминокислотных остатков, формирующих вход в сайт связывания субстрата: (А) Cys-191:C α и Ser-217:C α и (Б) Cys-191:C α и Ser-218:C α . Силы в 80 пН были приложены к поверхностным аминокислотным остаткам, как описано на Рисунке 30.

Таким образом, проведенное нами компьютерное моделирование поведения ХТ под действием растягивающих сил показало, что результатом воздействия таких сил являются значительные изменения в области связывания субстрата. При этом воздействие сил не приводило к существенным изменениям в пространственной организации каталитической триады ХТ. Таким образом, результаты компьютерного моделирования подтверждают данные

кинетического эксперимента о влиянии НЧППП на K_M , а не на V_M для фермента в агрегатах типа МНЧ-ХТ-МНЧ.

Стоит отметить, что длина траектории в ходе компьютерного моделирования составила 20 нс, что определялось ограниченными вычислительными мощностями. Это время гораздо меньше, чем реальное время приложения сил со стороны МНЧ к молекулам фермента под воздействием НЧППП, которое составляет ~ 1 мс (оцениваемое как время продвижения колебательного фронта) [251]. Однако, компьютерное моделирование показало, что значимые для катализа изменения в структуре ферментативной глобулы могут происходить в течение первых 0,2-0,3 нс, а затем структура остается неизменной. Таким образом, предполагается, что длина траектории 20 нс может предсказать реальное поведение ХТ под действием сил, создаваемых МНЧ в НЧППП. В агрегате, содержащем большое число молекул фермента, во время действия НЧППП эти молекулы подвергаются тысячам циклов такого стресса. Измеряемая каталитическая активность и конформационные изменения являются усредненными значениями для таких множественных вкладов, что подчеркивается медленными временами их релаксации.

Таким образом, были синтезированы два агрегата типа МНЧ-ХТ-МНЧ, в которых были модифицированы поверхностные amino- или карбоксильные группы фермента. В обоих случаях были использованы условия связывания фермента с МНЧ, позволяющие получить агрегаты, в которых молекулы ХТ были бы связаны одновременно с несколькими МНЧ, что позволило максимизировать эффект воздействия НЧППП. Изменения, наблюдаемые во вторичной структуре ХТ в агрегатах под воздействием НЧППП, подтверждают теоретическую модель МНМ воздействия МНЧ на фермент. Анализ изменений во вторичной структуре ХТ в агрегатах показал, что в результате действия НЧППП наблюдалось практически полное исчезновение α -спиралей. При этом β -структуры и неупорядоченные структуры вели себя по-разному для различных агрегатов. Эффект воздействия НЧППП на структуру ХТ был обратим и проявлялся в большей степени для образца, в котором были модифицированы карбоксильные группы фермента. С помощью компьютерного моделирования и эксперимента по изучению влияния НЧППП на кинетические параметры ХТ в составе агрегатов был показан молекулярный механизм воздействия МНЧ на фермент в НЧППП, выражающийся в изменениях конформации субстрат-связывающей области ХТ. Так, компьютерное моделирование поведения ХТ под действием радиально направленных сил, приложенных к поверхностным остаткам, содержащим amino- или карбоксильные группы, показало, что подобное воздействие приводит к возможности деформации (схлопыванию) сайта связывания субстрата. В то же время оно не вызывало значимых изменений в каталитической триаде.

Анализ скоростей реакции гидролиза специфического субстрата под действием ХТ в агрегатах двух типов показал, что в результате воздействия НЧППП не наблюдается изменений значений k_{cat} , в то время как значения K_M увеличивались, что означает ухудшение связывания субстрата с ферментом. Данные кинетического эксперимента и молекулярного моделирования хорошо согласуются между собой. Воздействие НЧППП на активность ХТ в агрегатах было обратимым, что также хорошо согласуется с данными о восстановлении вторичной структуры ХТ после воздействия НЧППП. Таким образом, гипотеза МНМ стимулирования структуры фермента была подтверждена экспериментально, а также предложен молекулярный механизм МНМ воздействия МНЧ на фермент.

3.2.2. ИНАКТИВАЦИЯ АДГ В АГРЕГАТАХ ТИПА МНЧ-ФЕРМЕНТ-МНЧ («ДИМЕР») ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НЧППП

АДГ, фермент из класса оксидоредуктаз, который широко используются при разработке процессов синтеза различных соединений [252-256]. Так, АДГ способна как восстанавливать альдегиды и кетоны до спиртов, так и катализировать обратный процесс. В связи с необходимостью разработки различных методов удаленной регуляции ферментов посредством внешнего физического стимула, а также демонстрации общности МНМ подхода, была показана возможность управлять активностью АДГ под действием НЧППП. Впервые показано, что МНМ подход может быть применен не только для гидролаз, но и для оксидоредуктаз.

3.2.2.1. ПОЛУЧЕНИЕ АГРЕГАТОВ ТИПА МНЧ-АДГ-МНЧ

АДГ была иммобилизована на поверхности МНЧ магнетит-золото типа ядро-оболочка, функционализированных липоевой кислотой (МНЧ-ЛК), с помощью карбодиимидного метода. В отличие от иммобилизации ХТ (см. главу 3.2.2.1) связывание АДГ на поверхности МНЧ проводили в две стадии, разделив стадии активации карбоксильной группы и образования амидных связей между МНЧ и ферментом. Переход от одностадийной схемы к двухстадийной позволил избавиться от возможности образования нескольких слоев фермента на поверхности МНЧ и агрегатов белка в растворе, что могло приводить к снижению влияния НЧППП на активность фермента. Для инактивации фермента под воздействием НЧППП необходимым условием является наличие агрегатов, в которых фермент связан одновременно с несколькими МНЧ («димеры»). Поэтому для получения наибольшего количества таких агрегатов, а следовательно, и наибольшего влияния НЧППП на активность фермента варьировали условия связывания фермента с МНЧ (Таблица 6), такие как соотношение АДГ : МНЧ (10000:1 и 30000:1) и EDC/S-NHS : АДГ (соотношение EDC и S-NHS 1:1) в диапазоне от 6,5:1 до 200:1.

Таблица 6. Соотношения АДГ : МНЧ и EDC/S-NHS : АДГ, (соотношение EDC:S-NHS 1:1), использованные при связывании фермента с МНЧ. Концентрация МНЧ для реакции конъюгации составила $24,3 \times 10^{10}$ НЧ/мл. Молекулярная масса АДГ 150 кДа.

Образец	АДГ:МНЧ	EDC/S-NHS:АДГ
D1	10000:1	200:1
D2	10000:1	20:1
D3	30000:1	65:1
D4	30000:1	6.5:1

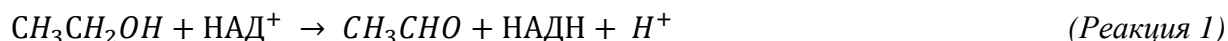
Гидродинамические характеристики синтезированных агрегатов МНЧ с АДГ, исследованные методом NTA, приведены в Таблице 7. Так, в результате связывания гидродинамический размер всех агрегатов АДГ с МНЧ увеличился в ~2-3 раза по сравнению с немодифицированными МНЧ. При этом для всех агрегатов наблюдался сдвиг положения моды на распределение НЧ по размерам в сторону больших значений, а также появление дополнительных мод на распределение НЧ по размерам (Таблица 7, см. приложение). Увеличение среднего размера, наличие сдвига моды в сторону больших значений, а также появление нескольких мод на распределение НЧ по размерам может говорить об образовании агрегатов, в состав которых входит несколько МНЧ [257]. Для всех образцов варьирование концентрации белка и сшивающих агентов в широких диапазонах не приводило к изменению гидродинамических параметров получаемых агрегатов. В ходе связывания АДГ наблюдалось снижение концентрации НЧ. Так, для агрегатов МНЧ с АДГ с низкой концентрацией белка (образцы D1-D2) наблюдалось снижение концентрации в ~5-10 раз по сравнению с немодифицированными МНЧ. При этом для агрегатов с высокой концентрацией белка (образцы D3-D4) изменения концентрации были не столь значительными. Снижение концентрации могло происходить во время очистки образцов при синтезе. Таким образом, в результате связывания АДГ с МНЧ-ЛК были получены образцы, гидродинамические характеристики которых говорят об образовании агрегатов, состоящих из нескольких МНЧ.

Таблица 7. Средний гидродинамический размер, положение максимумов на распределение НЧ по размерам и концентрация функционализированных МНЧ (МНЧ-ЛК) и агрегатов МНЧ с АДГ (образцы D1-D4), определенные методом НТА. Положение основного максимума показано жирным. Значения среднего размера представлено в виде среднего \pm стандартное отклонение.

Образец	Средний размер, нм	Положение максимумов на распределении, нм	Концентрация НЧ $\times 10^{10}$ НЧ/мл
МНЧ-ЛК	52 \pm 31	41	24.3
D1	147 \pm 104	75, 93	3.8
D2	158 \pm 82	62, 108 , 146, 329	2.5
D3	104 \pm 57	74 , 302	18.8
D4	159 \pm 109	92 , 171, 240	21.1

3.2.2.2. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЧПМП НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ АДГ В СОСТАВЕ АГРЕГАТОВ ТИПА МНЧ-ФЕРМЕНТ-МНЧ

За активностью АДГ в агрегатах типа МНЧ-фермент-МНЧ следили спектрофотометрически, регистрируя изменения концентрации НАДН в реакциях окисления этанола (*реакция 1*):



Изучение влияния НЧПМП на активность АДГ в составе агрегатов с МНЧ, как и в случае с активностью иммобилизованного ХТ (глава 3.2.1.3), производили в режиме постэффекта, когда субстраты (НАД⁺ и этанол) добавляли к агрегатам, которые были предварительно обработаны НЧПМП.

Было обнаружено, что варьирование соотношения реагентов в ходе связывания АДГ приводит к существенным изменениям значений начальной скорости V *реакции 1* (Рисунок 33 А). Так, увеличение количества фермента в 3 раза при связывании приводило к увеличению значений V *реакции 1* в ~2-4 раза (на Рисунке 33 А сравнить активность образцов D1-D2 и образцов D3-D4). При этом снижение концентрации EDC/S-NHS в 10 раз приводило к увеличению активности АДГ в агрегатах для всех соотношений АДГ:МНЧ (на Рисунке 33 А сравнить активности образцов D1-D2 между собой и образцов D3-D4 между собой). Следует отметить, что концентрация НЧ в *реакции 1* была одинаковой для всех экспериментов и составляла 1×10^{10} НЧ/мл. Количество связанного с МНЧ фермента было оценено косвенно по

его активности (рассеяние света НЧ не позволило определить концентрацию белка спектрофотометрически) Так, увеличение активности АДГ при увеличении концентрации фермента при его связывании с МНЧ может свидетельствовать о том, что большее количество фермента связалось с МНЧ (как ковалентно, так и нековалентно). В то же время снижение активности иммобилизованной АДГ в результате увеличения концентрации EDC/S-NHS в реакции конъюгации свидетельствует о возможном затрагивании групп активного центра при связывании с МНЧ. Таким образом, изменение ферментативной активности связано с различным количеством АДГ на поверхности МНЧ или изменением концентрации активных центров фермента.

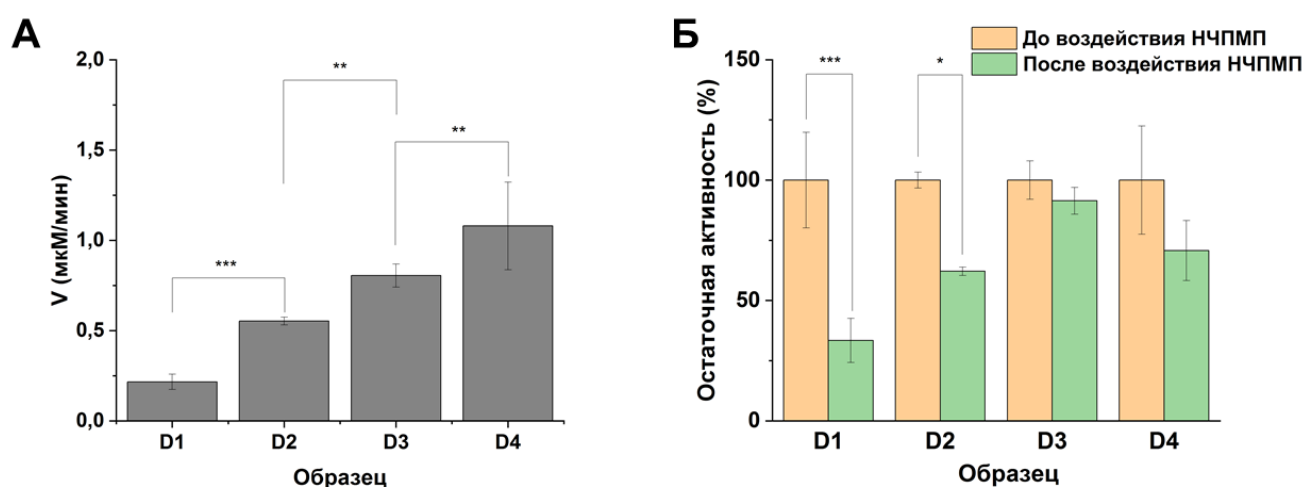


Рисунок 33. Влияние трех циклов «пульсирующего» НЧПМП ($f = 50$ Гц, $B = 140$ мТл, Пульс/Пауза = 1 мин/30 с) на ферментативную активность АДГ в составе агрегатов МНЧ-АДГ-МНЧ. (А) Начальные скорости реакции I (V) для образцов, полученных при разных соотношениях белка и сшивающих агентов (D1-D4). (Б) Изменение активности АДГ в результате воздействия НЧПМП. Концентрация агрегатов 1×10^{10} НЧ/мл. 20 мМ ТРИС-буфер (рН 8,2), 0,2 М этанола, 2,8 мМ НАД⁺, 25°C. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка ($n \geq 3$); * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

На Рисунке 33 Б показано влияние НЧПМП на активность АДГ в составе агрегатов с МНЧ. Было обнаружено, что, как и в случае иммобилизованного ХТ, воздействие НЧПМП приводило к снижению значений V реакции I , катализируемой АДГ в составе агрегатов, причем глубина этих изменений была различна для разных образцов с различным содержанием белка и степени сшивки. Так, в результате воздействия НЧПМП значение остаточной активности составило (33 ± 9) % и (62 ± 2) % для образцов D1 и D2, соответственно. В то же время для образцов D3 и D4 изменения активности были менее выраженными (статистически незначимыми). Стоит отметить, что также не наблюдалось изменений активности нативной (не

связанной с МНЧ) АДГ в результате воздействия НЧППП. Для образцов D1-D4, синтезированных при различных соотношениях реагентов, наблюдалась различная степень воздействия НЧППП. Так, для образца D1, который был синтезирован при низкой концентрации фермента и высокой концентрации сшивающих агентов, наблюдался наибольший эффект инактивации в результате воздействия НЧППП. В то же время для образца D2, который был синтезирован при той же концентрации фермента, но более низкой концентрации сшивающих агентов, снижение активности было менее выражено. По всей видимости, количество связей МНЧ-фермент-МНЧ, наличие которых необходимо для более существенной инактивации фермента под действием НЧППП, в образце D2 было ниже, чем в образце D1. Увеличение концентрации фермента в реакции связывания с МНЧ не показывает существенного (статистически значимого) воздействия НЧППП на активность фермента из-за наличия адсорбированного фермента и/или связанного только с одной МНЧ.

Таким образом, наблюдаемое снижение активности АДГ в агрегатах типа МНЧ-фермент-МНЧ в результате воздействия НЧППП было аналогично инактивации ХТ в агрегатах типа МНЧ-ХТ-МНЧ (см. главу 3.2.1.3), несмотря на то, что эти ферменты из различных классов и имеют сильно различающуюся структуру. Таким образом, мы подтвердили общность МНМ подхода и полагаем что, как и в случае ХТ в агрегатах с МНЧ, снижение активности в агрегатах типа МНЧ-фермент-МНЧ является следствием вращательно-колебательных движений МНЧ в НЧППП. На Рисунке 34 показана схема такого воздействия на примере агрегата, состоящего из двух МНЧ и молекул фермента. Из схемы видно, что на поверхности МНЧ содержатся две «популяции» фермента: E_1 , связанная одновременно с несколькими МНЧ, и E_2 , - только с одной МНЧ. При вращательно-колебательных движениях МНЧ в НЧППП (Рисунок 34 Б) молекулы E_1 , доля которых не может превышать 10% от общего количества фермента на поверхности МНЧ, испытывают деформации растяжения, сдавливания, скручивания и сдвига [202]. Поскольку наблюдаемые изменения активности иммобилизованных на МНЧ ферментов под воздействием НЧППП значительно превышают 10%, часть молекул фермента из популяции E_2 также должна быть подвержена МНМ стимуляции. Так, часть молекул E_2 («субпопуляция» E_{2a}) может испытывать деформации сдавливания, скручивания и сдвига в результате того, что МНЧ, входящие в агрегат, неодинаковы по размеру, форме и величине магнитного момента, а вектор магнитной индукции ориентирован случайным образом относительно векторов μ . При этом доля таких молекул может достигать до 50% от общего числа молекул фермента в агрегате. Другая часть молекул E_2 («субпопуляция» E_{2b}) не будет подвержена воздействию сил со стороны МНЧ. Отметим, что субпопуляция E_{2a} располагается в непосредственной близости от молекул популяции E_1 , а молекулы популяции E_{2b} расположены вдалеке от популяции E_1 .

Таким образом, максимальная доля молекул фермента, которая может быть подвержена деформации со стороны МНЧ, составляет примерно 50-60%, что хорошо согласуется с максимальным снижением активности ферментов под воздействием НЧППП, полученным в данной работе. Стоит отметить, что наличие нековалентно связанного с МНЧ фермента должно увеличивать долю E_{2b} и, таким образом, снижать эффективность воздействия НЧППП на активность ферментов. Как видно из Рисунка 33 Б, снижение активности под воздействием НЧППП для образцов D1-D2 было значительно сильнее чем для образцов D3-D4. Мы предполагаем, что более высокая концентрация фермента в образцах D3-D4 приводила к увеличению доли E_{2b} и, в результате этого, наблюдаемый эффект НЧППП на активность фермента был незначительным.

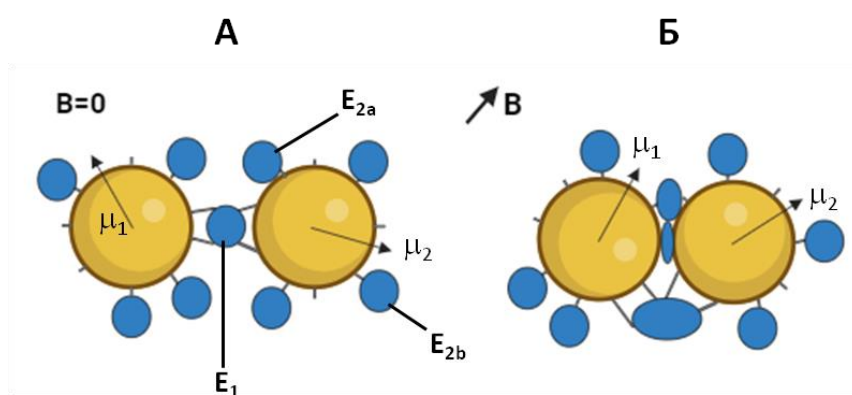


Рисунок 34. Схема МНМ подхода к управлению ферментативными реакциями. (А) Агрегат, состоящий из двух МНЧ с магнитными моментами μ_1 и μ_2 и молекул фермента (E_1 , E_{2a} , E_{2b}) на поверхности МНЧ. (Б) Вращательно-колебательные движения МНЧ, которые стремятся сориентировать свои магнитные моменты вдоль линий внешнего магнитного поля B , создают деформации растягивания, сжатия, скручивания и сдвига, приложенные к молекулам фермента E_1 и E_{2a} . Молекулы E_{2b} не подвержены воздействию механических деформаций.

Как следует из Таблицы 6, для достижения максимального эффекта влияния НЧППП на ферментативную активность АДГ в агрегатах с МНЧ варьировали такие условия реакции связывания, как соотношения фермента к НЧ и соотношение сшивающих агентов к ферменту. Нами было обнаружено, что эффект НЧППП на активность ферментов зависел как от структуры агрегатов, так и от наличия нековалентно связанного фермента. Несмотря на то, что все синтезированные агрегаты с АДГ имели «димерное» строение, только для образцов D1-D2 наблюдалось статистически значимое снижение ферментативной активности под действием НЧППП. Таким образом, увеличение гидродинамических размеров в результате связывания фермента на поверхности МНЧ не является показателем того, что в результате действия

НЧПМП будет наблюдаться инактивация фермента. Выбор условий реакции связывания должен основываться на влиянии НЧПМП на кинетические характеристики фермента в агрегате, что обычно является более сложной задачей, чем слежение за гидродинамическими параметрами. Однако, на основании экспериментальных данных можно сформулировать основные закономерности для выбора условий связывания фермента с поверхностью МНЧ, которые позволяют увеличить долю агрегатов типа МНЧ-фермент-МНЧ и снизить долю агрегатов типа МНЧ-фермент, тем самым повысив эффективность действия НЧПМП:

- изменение количества фермента в реакции связывания с поверхностью МНЧ (при неизменном количестве МНЧ) важно для активности и влияния НЧПМП. Очевидно, что увеличение концентрации фермента приводит к увеличению его активности в результате того, что большее количество фермента связывается с поверхностью МНЧ. Однако, при этом может увеличиваться количество нековалентно связанного фермента, что приводит к снижению эффективности действия НЧПМП.
- изменение количества сшивающих агентов в реакции связывания с поверхностью МНЧ (при неизменном количестве фермента) также важно для активности и влияния НЧПМП. Очевидно, что увеличение количества сшивающих агентов может подавлять активность фермента из-за возможной модификации групп активного центра. Однако увеличение количества сшивающих агентов может приводить к усилению влияния НЧПМП на фермент, благодаря увеличению доли агрегатов со структурой МНЧ-фермент-МНЧ.

Таким образом, впервые была продемонстрирована возможность использования МНМ подхода к управлению ферментативной активностью биотехнологически важного фермента АДГ. Варьируя условия реакции связывания ферментов с МНЧ, достигнута максимальная степень инактивации фермента 62%. На основе экспериментально полученных данных описаны основные закономерности при выборе условий проведения реакции связывания, влияющие на эффективность действия НЧПМП. Учитывая, что к данному моменту МНМ подход к управлению ферментативными реакциями был показан на примере четырех ферментов из двух разных классов, можно предположить, что с помощью него можно удаленно регулировать активность многих других ферментов, поскольку величины сил, создаваемые механическим движением МНЧ в НЧПМП, равные нескольким сотням пН, являются достаточными для того, чтобы значительно повлиять на структуру ферментов.

3.3. УПРАВЛЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ ФЕРМЕНТ-ИНГИБИТОР В АГРЕГАТАХ МНЧ-ФЕРМЕНТ И МНЧ-ИНГИБИТОР С ПОМОЩЬЮ НЧПМП

В результатах, изложенных выше, было подробно описано возможное влияние НЧПМП на структуру и активность ковалентно связанного с МНЧ фермента в составе «димерных» агрегатов. Однако, «димерный» агрегат типа МНЧ-белок-МНЧ может быть получен и в результате нековалентного взаимодействия фермент-ингибитор внутри агрегата. В данном подходе необходимо использовать отдельные «мономерные» агрегаты типа МНЧ-фермент и МНЧ-ингибитор, при смешивании которых происходит образование «димерного» агрегата за счет образования комплекса между ферментом и его белковым ингибитором. Силы, создаваемые вращательно-колебательными движениями МНЧ в таком агрегате под действием НЧПМП, потенциально способны нарушить межмолекулярные взаимодействия между белками в составе агрегата [206], поскольку силы, необходимые для разрыва таких взаимодействий, не превышают 100 пН [258-260]. Используя ингибиторы с различными константами ингибирования, можно «прощупать» прочность комплекса в агрегате и возможность его разрушения под действием НЧПМП. Для исследования были взяты два ингибитора ХТ: ингибитор трипсина (ИТ) и ингибитор Баумана-Бирк (ИББ), с существенно различающимися константами ингибирования ($K_i(\text{ИТ}) = 1, \times 10^{-6} \text{ М}$, $K_i(\text{ИББ}) = 6,4 \times 10^{-9} \text{ М}$).

3.3.1. ПОЛУЧЕНИЕ «ДИМЕРНЫХ» АГРЕГАТОВ МНЧ-ФЕРМЕНТ-ИНГИБИТОР-МНЧ ЗА СЧЕТ СВЯЗЫВАНИЯ «МОНОМЕРНЫХ» АГРЕГАТОВ МНЧ-ФЕРМЕНТ И МНЧ-ИНГИБИТОР

ХТ и ИТ были иммобилизованы на поверхности МНЧ типа ядро-оболочка, функционализированных липоевой кислотой (МНЧ-ЛК), с помощью карбодиимидного метода. Связывание белков проводили по двухстадийной схеме, позволяющей иммобилизовать белок в один слой на поверхности МНЧ, а также препятствующей образованию агрегатов белка в растворе. Синтезированные агрегаты, а также комплекс, образующийся при их смешивании, были охарактеризованы методами НТА (Рисунок 35 А-В, 8) и ПЭМ (Рисунок 35 Г-Е). Так, из Рисунка 35 А-В видно, что в результате смешивания «мономерных» агрегатов МНЧ-ХТ и МНЧ-ИТ происходит значительное увеличение гидродинамических размеров НЧ, что, вероятно, говорит об образовании «димерного» агрегата со структурой МНЧ-ХТ-ИТМНЧ. Данный факт также был подтвержден результатами микрофотографий ПЭМ (Рисунок 35Г-Е), из которых видно, что агрегаты МНЧ-ХТ и МНЧ-ИТ действительно представляют из себя «мономеры», в то время как образец МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ состоит из нескольких МНЧ, связанных парой фермент-ингибитор.

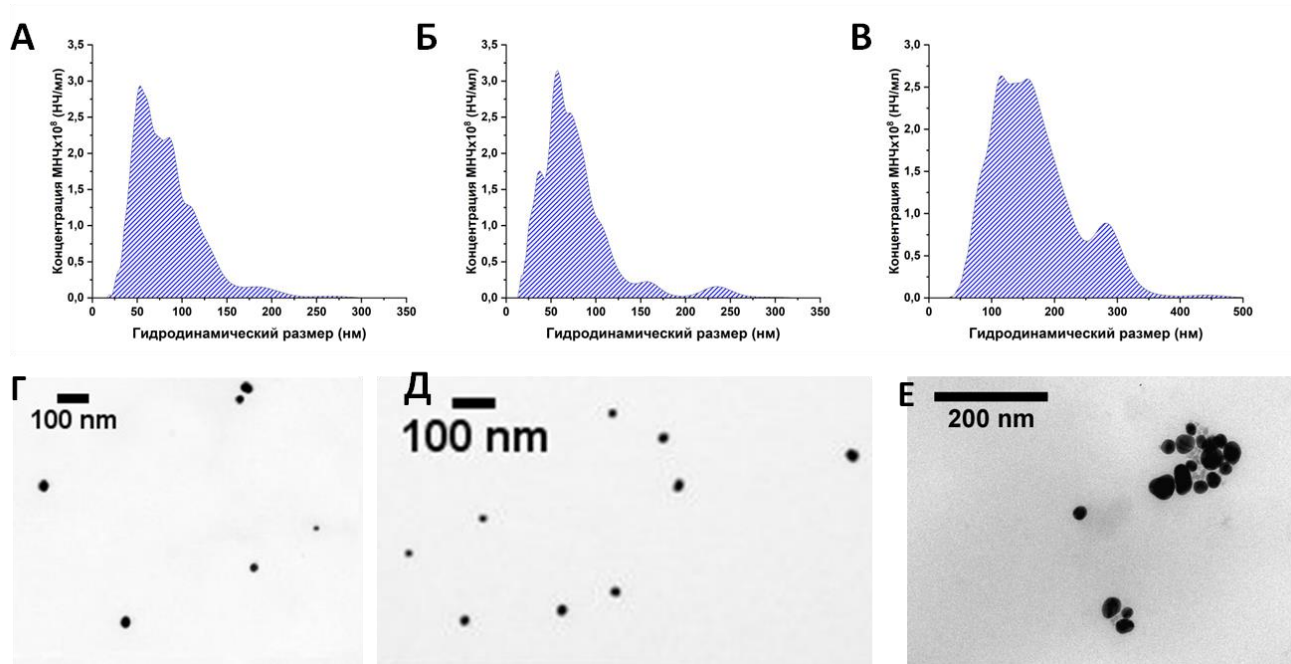


Рисунок 35. Характеризация агрегатов МНЧ-ХТ и МНЧ-ИТ, а также их комплекса МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ методами NTA и ПЭМ. (А-В) Распределение МНЧ по размерам образцов (А) МНЧ-ХТ, (Б) МНЧ-ИТ и (В) комплекса МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ. (Г-Е) Микрофотографии ПЭМ образцов соответствующих образцов. Для получения комплекса МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ использовали соотношение МНЧ-ХТ : МНЧ-ИТ ($C_I:C_E$) равное 20:1.

В Таблице 8 представлены средний размер и положения моды распределения НЧ по размерам, полученные на основании данных Рисунка 35 А-В. Так, средний размер агрегатов МНЧ-ХТ и МНЧ-ИТ увеличивался на 31 и 26 нм, соответственно, по сравнению с немодифицированными МНЧ, а положение моды распределения НЧ по размерам практически не изменялось. При этом средний размер и положение моды распределения для комплекса МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ, полученного смешиванием двух агрегатов, значительно возрастают. Стоит отметить, что увеличение среднего гидродинамического размера «мономерных» агрегатов на ~30 нм может говорить об образовании нескольких слоев белка на поверхности МНЧ в результате неспецифической сорбции.

Таблица 8. Средний гидродинамический размер и положение моды распределения НЧ по размерам для МНЧ, модифицированных липоевой кислотой (МНЧ-ЛК), агрегатов МНЧ-ХТ и МНЧ-ИТ, а также их комплекса МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ ($C_T:C_E = 20:1$), полученные на основании Рисунка 35 А-В. Данные среднего размера представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

Образец	Средний размер, нм	Положение моды распределения, нм
МНЧ-ЛК	53 ± 1	52
МНЧ-ХТ	84 ± 1	53
МНЧ-ИТ	79 ± 2	57
Комплекс МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ	170 ± 2	116

Для изучения возможности разрушения комплекса между ХТ и ИББ в составе агрегата типа МНЧ-ХТ-ИББ-МНЧ под действием НЧПМП использовали ГМНЧ, которые предварительно были функционализированы липоевой кислотой и конъюгатом нитродофамин-ПЭГ (НД-ПЭГ). Липоевая кислота, связанная с поверхностью золота за счет образования связи S-Au, обеспечивала дальнейшее связывание МНЧ с белками, а НД-ПЭГ, связанный с поверхностью магнетита через гидроксильные группы бензольного кольца нитродофамина, обеспечивал МНЧ высокую коллоидную стабильность в водных растворах. Функционализацию поверхности ГМНЧ, схема которой представлена на Рисунке 36, проводили в две стадии: на первой молекулы липоевой кислоты вытесняли часть органических молекул (олеиновая кислота, олеиламин и 1,2-гексадекандиол) и связывались с поверхностью золота (ГМНЧ-ЛК), на второй НД-ПЭГ вытеснял оставшиеся органические молекулы и связывался с поверхностью магнетита (ПЭГ-ГМНЧ-ЛК).

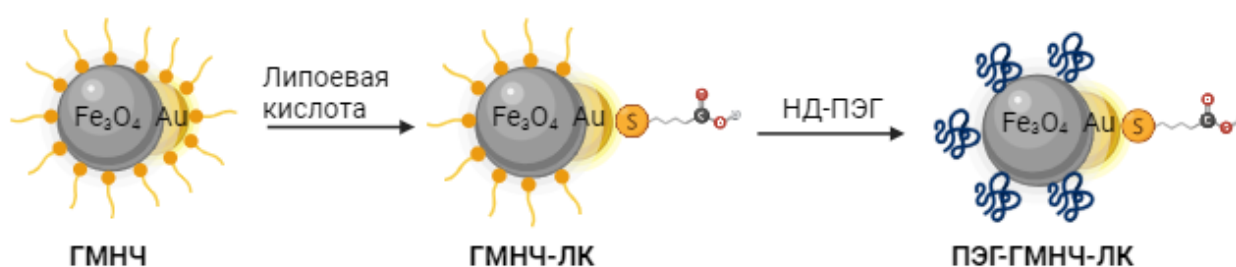


Рисунок 36. Схема функционализации поверхности ГМНЧ липоевой кислотой и НД-ПЭГ. На первом этапе молекулы липоевой кислоты вытесняют часть органических молекул, сорбированных на поверхности ГМНЧ после синтеза (показаны оранжевым), и образуют связь S-Au (ГМНЧ-ЛК). На втором этапе НД-ПЭГ (показан синим) вытесняет оставшуюся часть органических молекул и связывается с поверхностью магнетита (ПЭГ-ГМНЧ-ЛК).

Успешность функционализации поверхности ГМНЧ была подтверждена с помощью ИК-Фурье спектроскопии. На Рисунке 37 представлены ИК-спектры ГМНЧ, ГМНЧ-ЛК и ПЭГ-ГМНЧ-ЛК. Визуальный анализ полученных спектров показал, что спектры ГМНЧ и ГМНЧ-ЛК практически не отличаются друг от друга. В то же время спектр ПЭГ-ГМНЧ-ЛК имеет ряд существенных отличий, главным из которых является полоса поглощения с максимумом на 1086 см^{-1} , соответствующая колебаниям связи С-О в цепи ПЭГ. В Таблице 9 представлены данные о положениях максимумов наблюдаемых на спектрах полос поглощений, а также соотнесение этих полос с колебаниями связей в молекулах на поверхности ГМНЧ, ГМНЧ-ЛК и ПЭГ-ГМНЧ-ЛК. Так, в результате функционализации ГМНЧ липоевой кислотой на спектре появляется дополнительная полоса с максимумом при 1536 см^{-1} , отвечающая протонированному и депротонированному состояниям карбоксильной группы липоевой кислоты. Данная полоса не может соответствовать колебаниям в молекуле олеиновой кислоты, поскольку ее карбоксильная группа прочно связана с поверхностью ГМНЧ. Дополнительно функционализация ГМНЧ липоевой кислотой была подтверждена по изменению дзета-потенциала НЧ с помощью метода DLS (0 и -40 мВ, соответственно). Также из Таблицы 9 видно что на спектре ПЭГ-ГМНЧ-ЛК появляются дополнительные полосы с максимумами при 1651 см^{-1} , 1494 см^{-1} , 1349 см^{-1} , 1278 см^{-1} и 1086 см^{-1} , соответствующие колебаниям амидной связи, С-С-связи в ароматическом кольце нитродофамина, связи N-O нитрогруппы, связи С-ОН нитродофамина и связи С-О ПЭГа, соответственно.

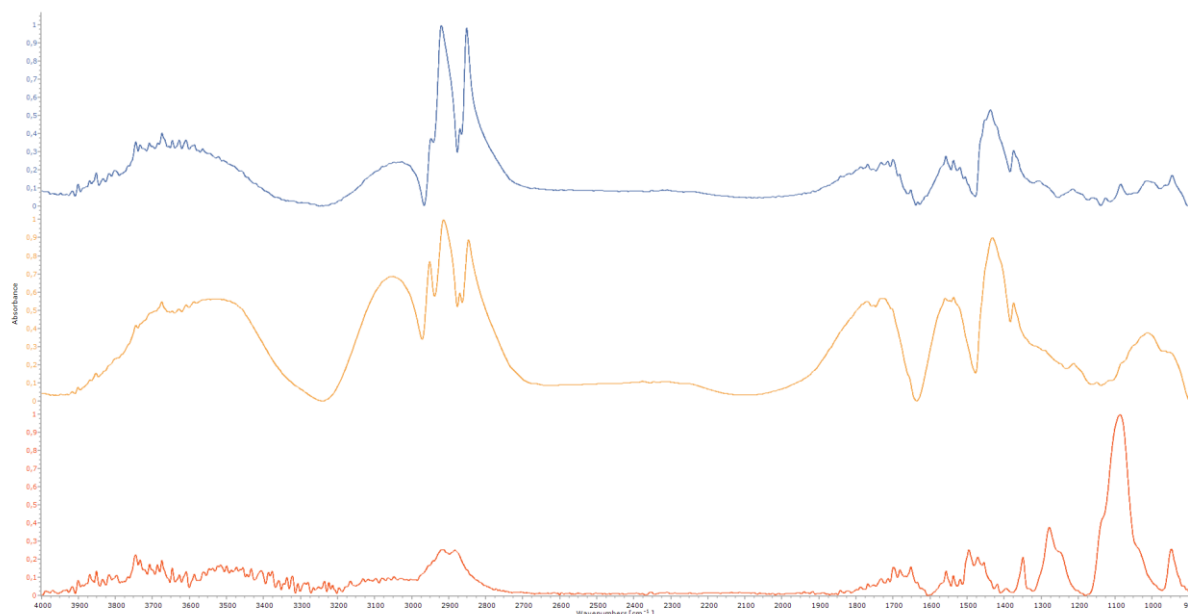


Рисунок 37. ИК-Фурье спектры ГМНЧ (синий), ГМНЧ-ЛК (оранжевый), и ПЭГ-ГМНЧ-ЛК (красный).

Таблица 9. Соотнесение полос поглощения ГМНЧ, ГМНЧ-ЛК, и ПЭГ-ГМНЧ-ЛК с функциональными группами на поверхности НЧ. На основании данных Рисунка 42.

Образец	Волновое число, см ⁻¹	Функциональная группа
ГМНЧ	3900-3300	-ОН гидроксильной группы гексадекандиола
	3027	-ОН карбоксильной группы олеиновой кислоты
	2920	-CH ₂
	2851	-CH ₂
	1700	C=O карбоксильной группы олеиновой кислоты
	1557	Полоса отвечающая за комплексную связь между поверхностью магнетита и -ОН-группами
	1437	O-H гидроксильной группы 1,2-гексадекандиола
ГМНЧ-ЛК	3900-3300	-ОН гидроксильной группы гексадекандиола
	3049	-ОН карбоксильной группы олеиновой кислоты
	2951	-CH ₂
	2914	-CH ₂
	2846	-CH ₂
	1768	C=O карбоксильной группы липоевой кислоты
	1734	C=O карбоксильной группы липоевой кислоты
	1559	Полоса отвечающая за комплексную связь между поверхностью магнетита и -ОН-группами
	1536	C-O карбоксильной группы липоевой кислоты
	1432	-ОН
ПЭГ-ГМНЧ-ЛК	2913	-CH ₂
	2882	-CH ₂
	1699	C=O карбоксильной группы липоевой кислоты
	1651	C-N конъюгата нитродофамин-ПЭГ
	1557	Полоса отвечающая за комплексную связь между поверхностью магнетита и -ОН-группами
	1494	C-C ароматического кольца нитродофамин
	1349	N-O нитрогруппы нитродофамин
	1278	C-O нитролофамин
	1086	C-O полиэтиленгликоля

Важным параметром, определяющим успешность получения агрегатов МНЧ с белками заданного строения, является информация о количестве функциональных групп на поверхности МНЧ. Наиболее часто для этих целей в литературе используют хромофорные или флуоресцентные метки, селективно связывающиеся с интересующими группами. Однако,

рассеяние света НЧ, приводящее к тому, что сигнал поглощения или флуоресценции увеличивается или снижается, соответственно, не позволяет применять такие метки напрямую. Нами предложен новый метод определения концентрации карбоксильных групп липоевой кислоты на поверхности ПЭГ-ГМНЧ-ЛК с помощью флуоресцентной метки PDAM, селективно связывающейся с карбоксильными группами, и цианида калия, способного «растворить» золото.

Концентрация карбоксильных групп, определенная на основе разработанного метода, по градуировочной кривой стандартных образцов составила $(4,8 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$ М. Учитывая, что концентрация ПЭГ-ГМНЧ-ЛК, определенная методом NTA, составила $1,7 \cdot 10^{13}$ НЧ/мл, количество карбоксильных групп, приходящихся на одну ГМНЧ, составило 170 ± 18 . Нами проведен теоретический анализ полученного значения. Так, диаметр золота, входящих в ГМНЧ, составил $3,4 \pm 0,1$ нм (см. главу 3.1.1), а площадь его поверхности ~ 36 нм². Если предположить, что молекулы липоевой кислоты полностью покрывают золотую поверхность ПЭГ-ГМНЧ-ЛК, то количество таких молекул не может превышать 181 на одну НЧ. Таким образом, полученное нами экспериментальное значение концентрации карбоксильных групп близко к теоретической оценке количества молекул липоевой кислоты, образующих монослой на золотой поверхности ПЭГ-ГМНЧ-ЛК.

ХТ и ИББ были иммобилизованы на поверхности ПЭГ-ГМНЧ-ЛК с помощью карбодиимидного метода. На Рисунке 38 представлены данные о характеристике агрегатов ПЭГ-ГМНЧ-ЛК с ХТ (ГМНЧ-ХТ) и ПЭГ-ГМНЧ-ЛК с ИББ (ГМНЧ-ИББ) методами NTA и ПЭМ. По данным метода NTA в результате связывания белков с ПЭГ-ГМНЧ-ЛК наблюдались значительные изменения на графиках распределений НЧ по размерам (Рисунок 38А). Так, для немодифицированных ГМНЧ наблюдается один широкий пик с максимумом при 149 нм, в то время как графики распределения по размерам для агрегатов ГМНЧ с белками имеет гораздо более сложный вид, в них наблюдается появление нескольких максимумов. Средний гидродинамический размер, определенный из графиков распределения по размерам, для немодифицированных ГМНЧ и агрегатов представлен в Таблице 10, из которой видно, что гидродинамический размер агрегата ГМНЧ-ХТ несущественно увеличился по сравнению с немодифицированными ГМНЧ. В то же время гидродинамический размер агрегата ГМНЧ-ИББ увеличился значительно по сравнению с немодифицированными ГМНЧ, что, во всей видимости, объясняется появлением в системе агрегатов, в состав которых входило несколько ГМНЧ. На микрофотографиях ПЭМ обоих агрегатов наблюдаются крупные скопления НЧ (Рисунок 38 Б, В), которые, вероятно, образовались при высыхании капли на медной сетке для микроскопии.

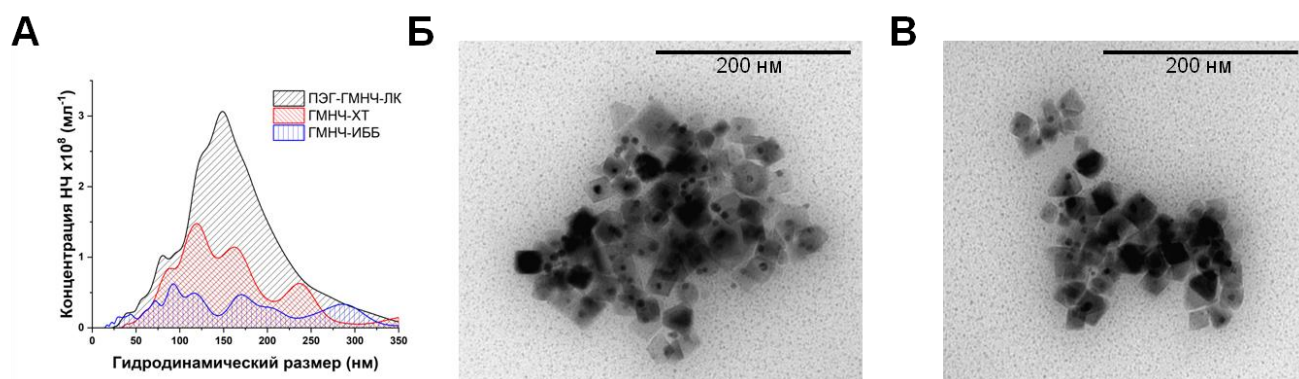


Рисунок 38. Характеризация ПЭГ-ГМНЧ-ЛК, а также агрегатов ГМНЧ-ХТ и ГМНЧ-ИББ методами NTA и ПЭМ. (А) Распределение НЧ по размерам. (Б, В) Микрофотографии (Б) ГМНЧ-ХТ и (В) ГМНЧ-ИББ.

Таблица 10. Средний гидродинамический размер ПЭГ-ГМНЧ-ЛК, а также агрегатов ГМНЧ-ХТ и ГМНЧ-ИББ. На основании данных Рисунка 38 А.

Образец	Средний размер, нм
ПЭГ-ГМНЧ-ЛК	166 ± 2
ГМНЧ-ХТ	180 ± 5
ГМНЧ-ИББ	270 ± 19

3.3.2. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЧПМП НА ВОЗМОЖНОСТЬ РАЗРУШЕНИЯ КОМПЛЕКСА ФЕРМЕНТ-ИНГИБИТОР В СОСТАВЕ АГРЕГАТА МНЧ-ФЕРМЕНТ-ИНГИБИТОР-МНЧ

За активностью ХТ в составе агрегата МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ следили спектрофотометрически по образованию окрашенного продукта в реакции гидролиза NSAAPFpNA при длине волны 405 нм. Предварительно было подобрано оптимальные соотношения агрегатов МНЧ-ИТ к МНЧ-ХТ ($C_I:C_E$) в смеси, а также время, необходимое для связывания иммобилизованных ХТ и ИТ (Рисунок 39). Из Рисунка 39 видно, что при смешивании агрегатов МНЧ-ХТ и МНЧ-ИТ как и следовало ожидать происходит снижение активности фермента, зависящее от соотношения $C_I:C_E$ и времени предварительной инкубации. Так, из Рисунка 39 А видно, что при увеличении $C_I:C_E$ (при времени предварительного инкубирования равное 60 с.) остаточная активность ХТ снижалась, достигая значения $42 \pm 10\%$ при соотношении $C_I:C_E = 20:1$. При дальнейшем увеличении соотношения $C_I:C_E$ значение остаточной активности практически не изменялось (Рисунок 39 А). Для соотношения $C_I:C_E = 20:1$ можно добиться более глубокого ингибирования фермента, увеличивая время предварительного инкубирования, что видно из Рисунка 39 Б. Так, было обнаружено, что остаточная активность ХТ в агрегате МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ ($C_I:C_E = 20:1$) снижается до $30 \pm 5\%$ при времени инкубирования 90 с., после чего остается неизменной. Значительно увеличивая

соотношение $C_I:C_E$, мы могли бы достичь еще более глубокого ингибирования ХТ, однако, для изучения влияния НЧПМП нам было важно, чтобы активность ХТ в агрегате МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ была отлична от нуля. Таким образом, для дальнейшей работы были выбраны условия соотношения $C_I:C_E$ и времени инкубирования, которые составили 20:1 и 90 с. соответственно.

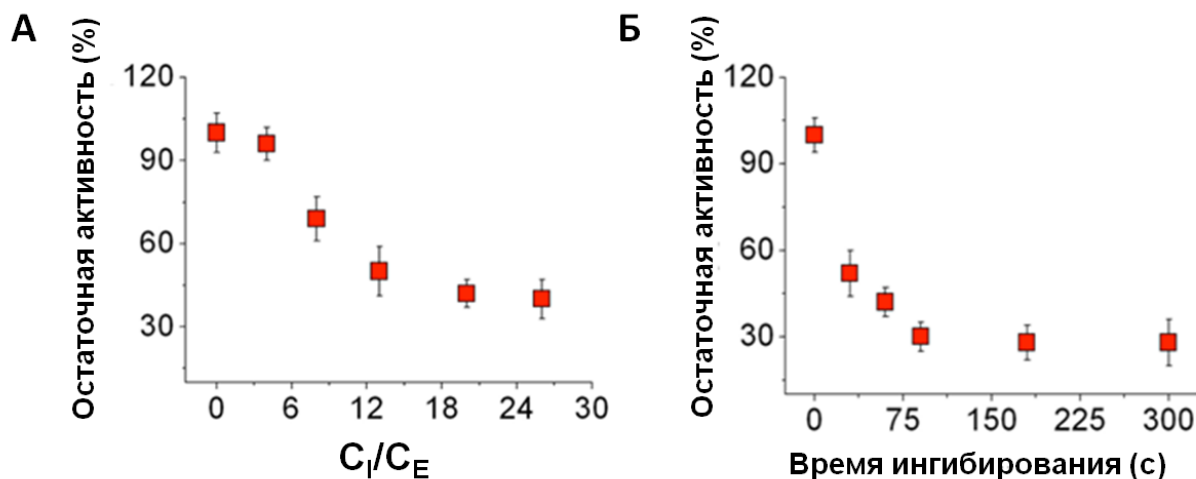


Рисунок 39. Зависимость остаточной активности ХТ в агрегате МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ от (А) соотношения МНЧ-ИТ : МНЧ-ХТ ($C_I:C_E$) и (Б) времени предварительного инкубирования при $C_I:C_E = 20:1$. 20 мМ ТРИС-буфер (рН 8,2), концентрация NSAAPFpNA 7,5 мкМ, 25°C.

Для изучения влияния НЧПМП на активность ХТ в составе агрегата МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ, а также возможность разрушения комплекса в составе агрегата использовали функцию генерирования МП *in situ*, регистрируя кинетические кривые непосредственно под действием НЧПМП. На Рисунке 40 показаны кинетическая кривая и остаточная активность ХТ в агрегате МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ в отсутствие и присутствии НЧПМП. Как видно из Рисунка 40 А, включение НЧПМП вызывало увеличение тангенса угла наклона кинетической кривой, что означает увеличение скорости реакции и активности фермента. На Рисунке 40 Б приведены данные остаточной активности фермента в агрегате после статистической обработки серии из трех кинетических кривых в виде процента к исходной активности в отсутствие МНЧ-ИТ, из которых видно, что под действием НЧПМП активность ХТ увеличивалась в 1,5 раза.

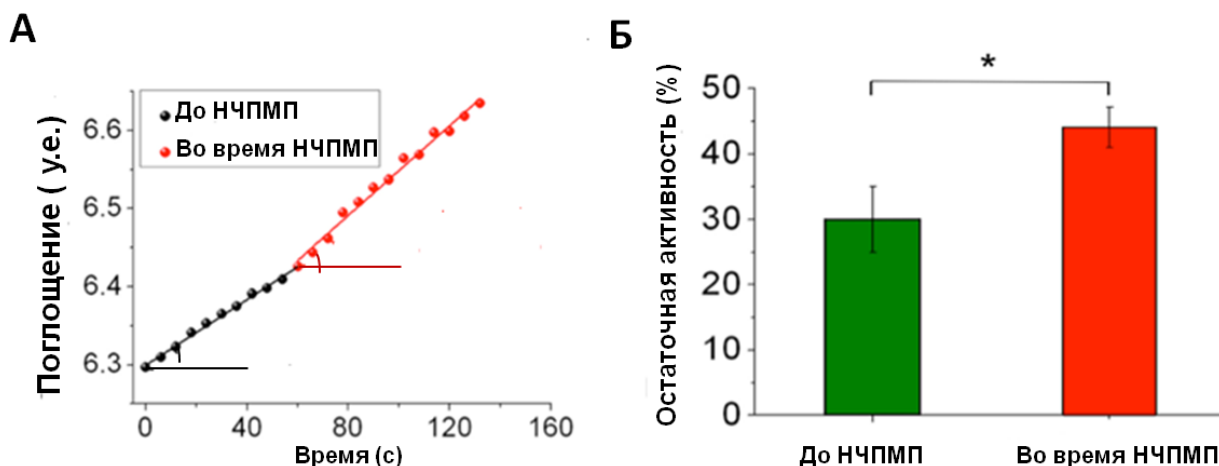


Рисунок 40. Влияние НЧПМП ($f = 60$ Гц, $B = 88$ мТл) на активности ХТ в агрегате МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ. (А) Кинетическая кривая продукт-время (выраженная в единицах поглощения). (Б) Остаточная активность фермента после статистической обработки серии кинетических кривых. За 100% взята активность ХТ в агрегате МНЧ-ХТ. $C_I:C_E = 20:1$, 20 мМ ТРИС-буфер (рН 8,2), 7,5 мкМ NSAAPFpNA, 25°C; $n=3$ * $p \leq 0,05$.

Предполагаемый механизм восстановления активности ХТ в агрегате МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ под действием НЧПМП заключается в следующем (Рисунок 41):

- При смешивании двух «мономерных» агрегатов, МНЧ-ХТ и МНЧ-ИТ, происходит образование «димера» типа МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ за счет образования комплекса между ферментом и ингибитором, в результате чего активность ХТ снижается (Рисунок 40 Б, зеленый столбик).
- Силы, возникающие при вращательно-колебательных движениях МНЧ в НЧПМП, могут вызывать нарушение взаимодействия между ХТ и ИТ, результатом которого оказывается открытие (деблокирование) активного центра фермента для доступа субстрата, что приводит к восстановлению активности фермента (Рисунок 40 Б, красный столбик).

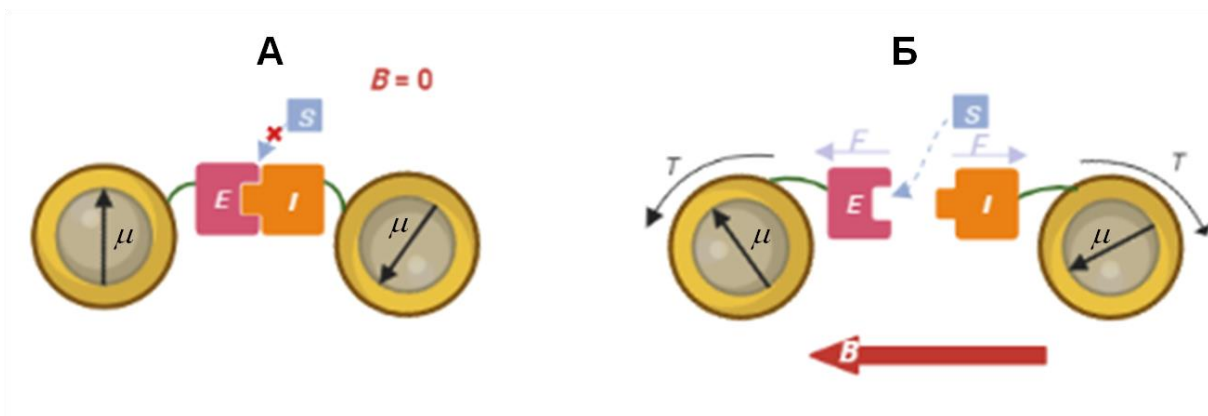


Рисунок 41. Схема восстановления активности фермента (E) в агрегате со строением МНЧ-фермент-ингибитор-МНЧ под действие НЧППП. (А) Образование «димерного» агрегата при взаимодействии E и I , приводит к блокированию активного центра фермента для доступа субстрата S . (Б) Действие НЧППП напряженности B , вызывающего вращательно-колебательные движения (T) МНЧ, приводит векторы магнитного момента μ к стремлению ориентироваться вдоль линий внешнего магнитного поля, что создает силы F , разрушающие взаимодействие между E и I , и открывающие доступ для субстрата S . Схема не показывает молекулы E и I на поверхности МНЧ, которые не взаимодействуют между собой.

В ряде контрольных экспериментов мы убедились в том, что воздействие НЧППП не приводит к восстановлению активности ХТ составе «мономерных» агрегатов МНЧ-ХТ-ИТ и МНЧ-ИТ-ХТ (Рисунок 42). Из рисунка видно, что включение НЧППП не приводило к изменению тангенса угла наклона кинетических кривых, а, следовательно, и активности ХТ в составе таких «мономерных» агрегатов. Как было сказано ранее (раздел 3.2), воздействие НЧППП на «мономерный» агрегат вызывает генерацию только гидродинамических сил, воздействующих на белки на поверхности МНЧ. Величины этих сил не способны привести к разрыву взаимодействия между ферментом и его ингибитором. Таким образом, мы показали, что силы, создаваемые вращательно колебательными движениями МНЧ в «димерном» агрегате МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ, получаемом из «мономерных» агрегатов МНЧ-ХТ и МНЧ-ИТ, достаточны для разрушения взаимодействия фермент-ингибитор и частичной активации фермента.

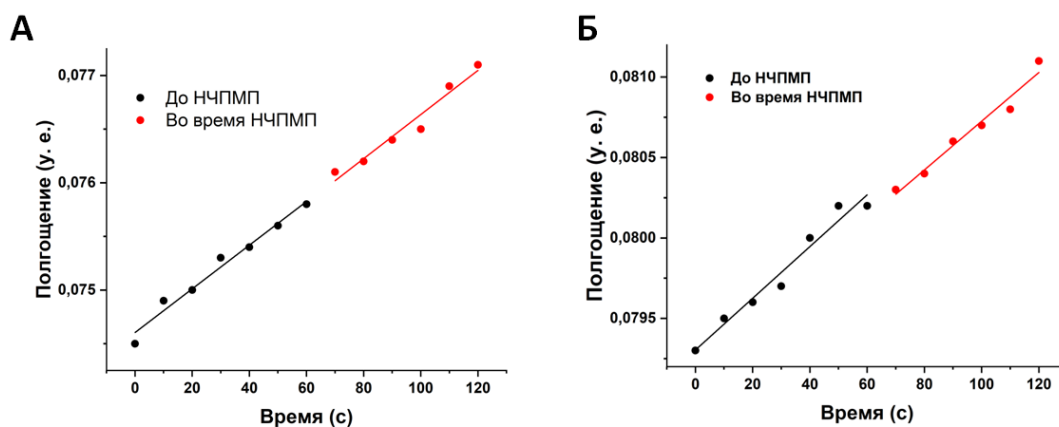


Рисунок 42. Влияние НЧПМП ($f = 60$ Гц, $B = 88$ мТл) на ход кинетических кривых продукт-время (выраженных в единицах поглощения) под воздействием ХТ в составе агрегатов (А) МНЧ-ХТ-ИТ и (Б) МНЧ-ИТ-ХТ. Для получения агрегата МНЧ-ХТ-ИТ использовали агрегат МНЧ-ХТ (1×10^8 НЧ/мл) и неиммобилизованный ИТ (10 мкг/мл). Для получения агрегата МНЧ-ИТ-ХТ использовали агрегат МНЧ-ИТ (2×10^9 НЧ/мл) и неиммобилизованный ХТ (1 мкг/мл). NSAAPFpNA 7,5 мкМ, 20 мМ ТРИС-буфер (рН 8,2), 25°C.

Следует отметить, что в результате действия НЧПМП на агрегат типа МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ не наблюдалось восстановления активности ХТ до уровня исходной активности фермента в отсутствие ингибитора (Рисунок 40Б). В данном случае силы, вызывающие разрыв связи между ферментом и ингибитором, могут приводить и к деформации молекул фермента и ингибитора, способной изменить вторичную/третичную структуру фермента, что приводит к снижению его активности. Кроме того, вероятно, в системе существует динамическое равновесие между связанной и несвязанной с ингибитором формой фермента.

За активностью ХТ в составе агрегата ГМНЧ-ХТ-ИББ-ГМНЧ следили аналогично агрегату МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ. Предварительно также было подобрано оптимальное соотношение агрегатов ГМНЧ-ИББ к ГМНЧ-ХТ ($C_I:C_E$) таким образом, чтобы остаточная активность ХТ была отлична от нуля. Из Рисунка 43 видно, что уже при $C_I:C_E = 1:1$ наблюдалось резкое снижение остаточной активности ХТ до $\sim 40\%$. При дальнейшем увеличении соотношения $C_I:C_E$ остаточная активность продолжала снижаться и достигла 10% при значении $C_I:C_E = 6:1$. Шестикратный избыток ингибитора по отношению к ферменту и был выбрано для дальнейшего изучения влияния НЧПМП.

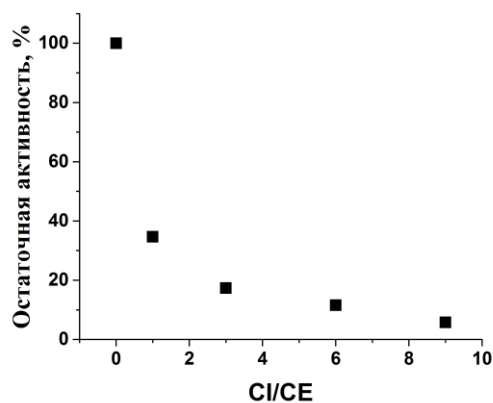


Рисунок 43. Зависимость остаточной активности ХТ в агрегате ГМНЧ-ХТ-ИББ-ГМНЧ от соотношения ГМНЧ-ИББ : ГМНЧ-ХТ ($C_I:C_E$). Концентрация ГМНЧ-ХТ $7,4 \times 10^8$ НЧ/мл. 20 мМ ТРИС-буфер (рН 8,2), 80 мкМ NSAAPFpNA, 25°C.

Кинетические данные о воздействии НЧПМП на активность ХТ в агрегате ГМНЧ-ХТ-ИББ-ГМНЧ, изученном при различной величине индукции МП, представлены на Рисунке 44. Из рисунка видно, что воздействие НЧПМП приводило к принципиально иному эффекту влияния НЧПМП на активность ХТ в составе агрегата. Нами не обнаруживалось восстановления активности фермента под действием НЧПМП (Рисунок 44А), которое ранее наблюдалось для агрегата МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ (Рисунок 40). Мы предполагаем, что силы, создаваемые вращательно-колебательными движениями МНЧ в НЧПМП, в данном случае оказались недостаточными для разрыва комплекса с высокой аффинностью. Более того, при высоких значениях индукции B НЧПМП наблюдалась полная потеря активности фермента (Рисунок 44 Б, В). Важно отметить, что для всех значений B НЧПМП изменения были обратимыми: активность фермента восстанавливалась при отключении НЧПМП (Рисунок 44 синие точки). На Рисунке 44Г показана статистическая обработка серии кривых, демонстрирующих описанные изменения в агрегате ГМНЧ-ХТ-ИББ-ГМНЧ.

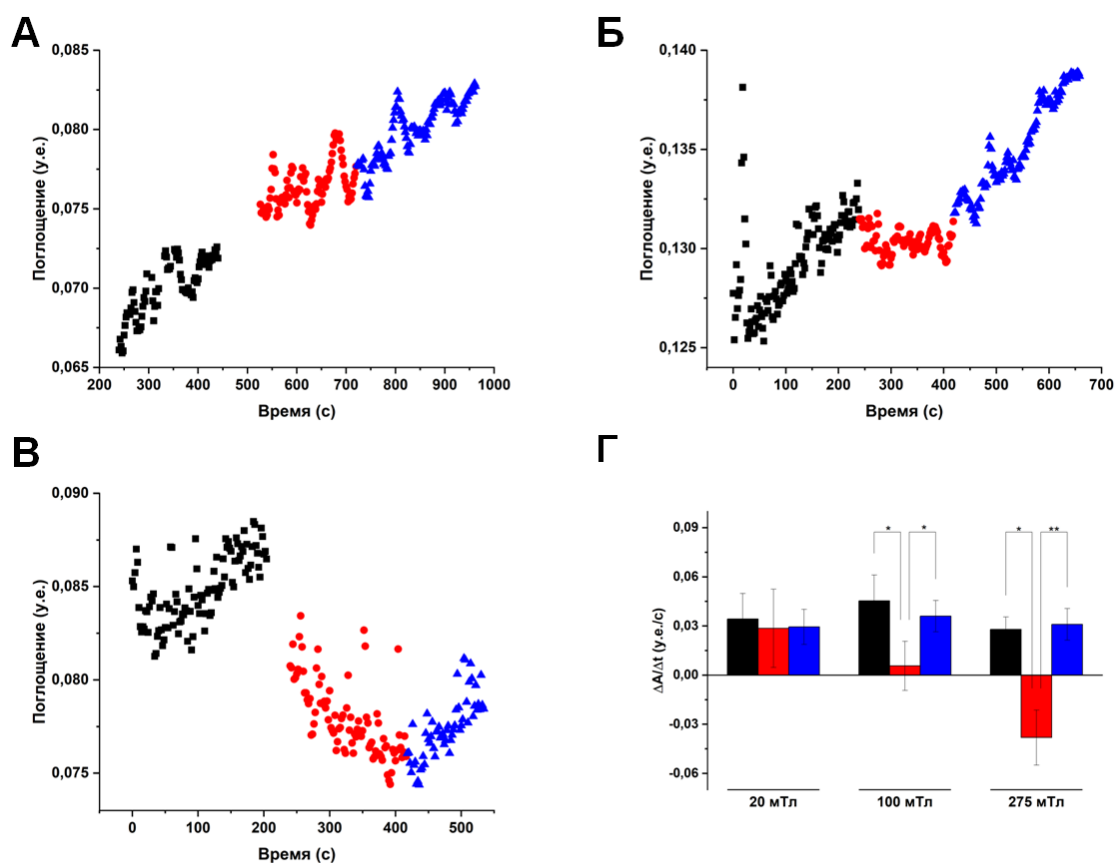


Рисунок 44. Влияние включения и выключения НЧПМП ($f = 50$ Гц) на активность фермента в агрегате ГМНЧ-ХТ-ИББ-ГМНЧ. (А-В) Влияние НЧПМП напряженностью (А) 20 мТл, (Б) 100 мТл и (В) 275 мТл на ход кинетических кривых продукт-время (выраженных в единицах поглощения). (Г) Значения скорости реакции ($\Delta A/\Delta t$) в серии из трех кривых. На всех графиках черным показан участок до воздействия НЧПМП, красным – участок под воздействием НЧПМП, синим – участок после прекращения воздействия НЧПМП. $C_T:C_E = 6:1$. Концентрация ГМНЧ-ХТ $7,4 \times 10^8$ НЧ/мл. 20 мМ ТРИС-буфер (рН 8,2), 40 мкМ NSAAPFpNA, 25°C. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ ($n = 3$).

В контрольном эксперименте было показано, что НЧПМП не приводит к изменению активности ХТ в составе «мономерного» агрегата ГМНЧ-ХТ (Рисунок 45). Так, из Рисунка 45 А видно, что наклон кинетической кривой продукт-время, выраженной в единицах поглощения, не изменяется под воздействием НЧПМП (сравнить с кинетической кривой для агрегата ГМНЧ-ХТ-ИББ-ГМНЧ на Рисунке 44 Б). На Рисунке 45 Б приведен статистический анализ серии кинетических кривых, из которого видно, что НЧПМП действительно не влияет на фермент в агрегате ГМНЧ-ХТ.

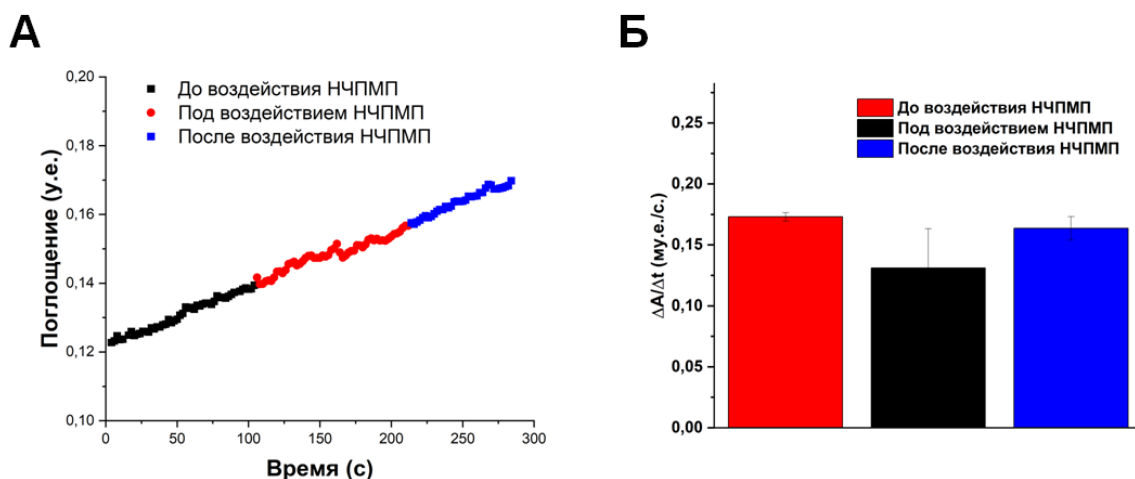


Рисунок 45. Влияние НЧПМП ($f = 50$ Гц, $B = 100$ мТл) на активность фермента в составе ГМНЧ-ХТ ($7,4 \times 10^8$ НЧ/мл) скорость реакции гидролиза NSAAPFrNA (40 мкМ): (А) кинетическая кривая продукт (выраженный)-время, (Б) значения скорости реакции (тангенса угла наклона dA/dt) кинетической кривой ($\Delta A/\Delta t$) до, во время и после воздействия НЧПМП. 20 мМ ТРИС-буфер (рН 8,2), 25°C; $n = 3$

Сравнивая кинетические данные для двух ингибиторов, мы можем видеть принципиально различное влияние НЧПМП: восстановление активности фермента и отсутствие такового в случае ИТ и ИББ, соответственно. Наблюдаемый эффект может быть обусловлен существенным различием констант ингибирования ($K_i(\text{ИТ})/K_i(\text{ИББ}) \approx 10^3$). Так, сил, создаваемых вращательно-колебательными движениями МНЧ в НЧПМП, в случае ИТ может быть достаточно для разрыва комплекса фермент-ингибитор в агрегате МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ, в то время как для ИББ таких сил, как видно, недостаточно. Таким образом, мы смогли «прощупать» условия, при которых возможно разрушить комплекс фермент-ингибитор типа МНЧ-фермент-ингибитор-МНЧ под действием НЧПМП.

Также, используя ингибитор с более прочным взаимодействием с ферментом, нам удалось не только добиться отсутствия разрушения комплекса фермент-ингибитор, но и полностью инактивировать ХТ (Рисунок 44Б, В). Такой эффект, вероятно, наблюдался в результате агрегации ГМНЧ под действием НЧПМП (Рисунок 46). Так, при образовании агрегата ГМНЧ-ХТ-ИББ-ГМНЧ, часть молекул ХТ все еще остается не связанной с ингибитором и доступна для субстрата (Рисунок 46А), что выражается в ненулевой активности (Рисунок 44). Воздействие НЧПМП на агрегат может вызывать образование более крупных агрегатов, в результате чего активный центр фермента становится полностью заблокированным для доступа субстрата (Рисунок 46 Б), и наблюдается его полная инактивация (Рисунок 45 Б, В). Стоит отметить, что подобных процессов агрегации под действием НЧПМП не наблюдалось для агрегата МНЧ-ХТ-

ИТ-МНЧ (глава 3.4.1), вследствие того, что золотая оболочка МНЧ, вероятно, препятствовала этому. Сравнивая данные активности ХТ в агрегате ГМНЧ-ХТ-ИББ-ГМНЧ при напряженности НЧПМП 100 и 275 мТл, нами наблюдались различия в ходе кинетической кривой (сравнить красные точки на Рисунке 45 Б, В). Из рисунка видно, что при включении НЧПМП напряженностью 100 мТл образование продукта ферментативной реакции полностью прекращалось (Рисунок 45Б красные точки), в то время как при интенсивности 275 мТл наблюдалось резкое снижение сигнала поглощения (Рисунок 45 В красные точки). Данный факт может говорить о том, что воздействие НЧПМП с большей интенсивностью приводит к образованию более крупных агрегатов, обладающих гораздо меньшей стабильностью и выпадающих в осадок.

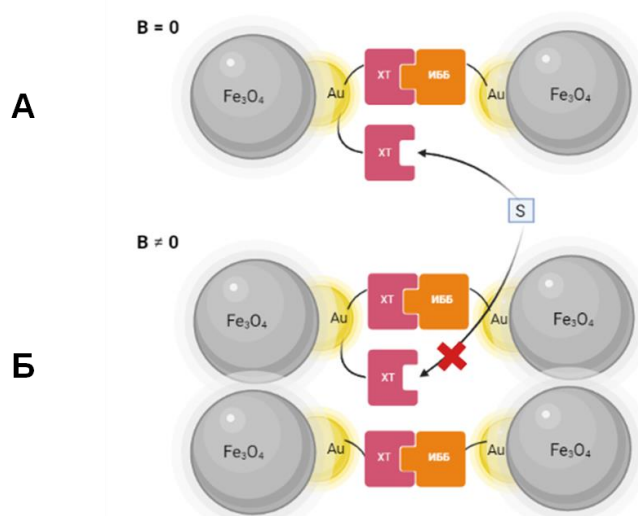


Рисунок 46. Схема поведения фермента в агрегате ГМНЧ-ХТ-ИББ-ГМНЧ в отсутствие и присутствии НЧПМП. (А) В отсутствие внешнего магнитного поля ($B = 0$) часть молекул ХТ, не связана с ингибитором, активный центр доступен для субстрата S . (Б) При воздействии НЧПМП ($B \neq 0$) не происходит разрыва комплекса ХТ-ИББ и происходит образование крупных агрегатов ГМНЧ, в результате которой активный центр полностью блокируется и становится недоступным для субстрата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы были получены «мономерные» и «димерные» агрегаты МНЧ с ХТ типа МНЧ-фермент и МНЧ-фермент-МНЧ, соответственно, чувствительные к воздействию НЧПМП. Доказана МНМ природа воздействия НЧПМП на ХТ в «димерном» агрегате состава МНЧ-ХТ-МНЧ, а также изучен молекулярный механизм инактивации фермента в агрегате. Воздействие НЧПМП приводило к изменению соотношения α -, β - и неупорядоченных структур и ухудшению связывания субстрата в активном центре ХТ, что также было подтверждено с помощью компьютерного моделирования. Эффект НЧПМП был обратим и зависел от типа модифицируемого аминокислотного остатка фермента в агрегате. Получены и охарактеризованы «димерные» агрегаты МНЧ с АДГ типа МНЧ-фермент-МНЧ, для которого также была показана инактивация фермента. Показано, что степень инактивации фермента в агрегате МНЧ-АДГ-МНЧ зависит от условий связывания фермента. На основании полученных экспериментальных данных сформулированы общие рекомендации к выбору условий получения агрегатов, позволяющие максимизировать влияние НЧПМП на активность ферментов. Получены и охарактеризованы «димерные» агрегаты типа МНЧ-фермент-ингибитор-МНЧ на основе «мономерных» агрегатов МНЧ-фермент и МНЧ-ингибитор. Показано, что, в зависимости от величины константы ингибирования, воздействие НЧПМП может приводить как к разрушению комплекса фермент-ингибитор в агрегате, так и к отсутствию такового. При использовании ИТ со сравнительно высокой константой ингибирования действие НЧПМП вызывало разрушение комплекса фермент-ингибитор в агрегате МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ и частичное восстановление активности ХТ. При использовании ИББ, константа ингибирования которого на три порядка ниже, чем константа ингибирования ИТ, нами не наблюдалось разрушения комплекса фермент-ингибитор в агрегате ГМНЧ-ХТ-ИББ-ГМНЧ и восстановления активности ХТ. Таким образом, были «просканированы» условия, при которых силы, создаваемые вращательно-колебательными движениями МНЧ в агрегатах под действием НЧПМП, оказываются достаточными для разрушения комплекса. Также для агрегата ГМНЧ-ХТ-ИББ-ГМНЧ, для которого воздействие НЧПМП не приводило к разрушению комплекса, показано, что НЧПМП может вызывать образование существенно более крупных агрегатов, в которых активный центр фермента был экранирован от взаимодействия с субстратом, в результате чего наблюдалась полная потеря активности фермента. Тем не менее, стоит отметить, что и в этом случае инактивация была полностью обратима.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что для синтезированных МНЧ типа ядро-оболочка и гантель различного размера и фазового состава предпочтителен Брауновский механизм релаксации во внешнем НЧПМП.
2. Воздействие НЧПМП на ХТ в составе агрегата типа МНЧ-ХТ-МНЧ приводит к изменению вторичной структуры белка (снижение доли альфа- и бета структур и увеличение доли неупорядоченных структур). Эти изменения вызывают снижение активности фермента (до 45%) в результате ухудшения связывания субстрата (увеличение K_M до 2,6 раз). Результаты компьютерного моделирования методом управляемой молекулярной динамики также свидетельствуют об изменении структуры субстрат-связывающего участка активного центра ХТ.
3. Воздействие НЧПМП на АДГ в составе агрегатов типа МНЧ-АДГ-МНЧ, как и в случае ХТ, приводит к снижению активности фермента (до 62%). На основе экспериментальных данных сформулированы общие рекомендации по выбору условий получения агрегатов различного строения, позволяющие максимизировать влияние НЧПМП на активность ферментов.
4. Показана возможность управления активностью ХТ в агрегате типа МНЧ-фермент-ингибитор-МНЧ под действием НЧПМП. Для ингибиторов ХТ, обладающих различными константами ингибирования, показано, что силы, возникающие при вращательно-колебательных движениях МНЧ в НЧПМП, могут как разрушать комплекс, так и нет. Обнаружено, что для агрегата МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ ($K_i=10^{-6}$ М) наблюдается частичное восстановление активности фермента, а для агрегата ГМНЧ-ХТ-ИББ-ГМНЧ ($K_i=10^{-9}$ М) восстановления активности не наблюдается. Более того, обнаружено, что под действием НЧПМП наблюдается обратимая полная остановка ферментативной реакции в результате образования существенно более крупных ассоциатов частиц и блокирования активного центра фермента для доступа субстрата.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю д.х.н., проф. Клячко Наталье Львовне за совместный многолетний труд, наставничество и всестороннюю помощь.

Автор благодарит д.х.н., проф. Кабанова Александра Викторовича за неоценимую помощь в обсуждении работы и поддержку в трудные минуты.

Автор благодарит скоропостижно скончавшегося д.ф.-м.н., проф. Головина Юрия Ивановича и сотрудников его института за конструирование приборной базы, благодаря которой была выполнена работа.

Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам кафедры химической энзимологии, особенно к.ф.-м.н. Уповову Игорю Владимировичу за помощь в молекулярном моделировании поведения химотрипсина, к.х.н., доц. Ле-Дейген Ирине Михайловне за помощь в определении элементов вторичной структуры химотрипсина, а также д.х.н., проф. Еремееву Николаю Леонидовичу, д.х.н., доц. Кудряшовой Елене Вадимовне и д.х.н., проф. Тишкову Владимиру Ивановичу за плодотворное обсуждение работы и ценные комментарии.

Автор выражает благодарность ведущему инженеру НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, к.б.н. Прусову Андрею Николаевичу за помощь в экспериментах с электронным микроскопом.

Автор выражает благодарность студентам, аспирантам и сотрудникам лаборатории химический дизайн бионаноматериалов, особенно к.х.н. Власовой Ксении Юрьевне, к.х.н., доц. Скурединой Анне Алексеевне, к.х.н. Лопухову Антону Владимировичу, к.х.н. Ефремовой Марии Владимировне, за помощь при проведении экспериментов и обсуждении работы, а также за дружелюбную атмосферу в лаборатории.

Автор выражает сердечную благодарность своим друзьям и близким, и особенно супруге Анастасии и маме Елене, за моральную поддержку, без которой бы не состоялось написание работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cipolatti E. P., Costa M., Henriques R. O., Costa J. C., Machado A., Freire D. M. G., Evelin Andrade M. Chapter 5 - Enzymes in Green Chemistry: The State of the Art in Chemical Transformations // *Advances in Enzyme Technology* / Singh R. S. и др. Elsevier, 2019. – С. 137-151.
2. Sun H., Zhang H., Ang E. L., Zhao H. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates // *Bioorg Med Chem.* – 2018. – Vol. 26. – № 7. – P. 1275-1284.
3. Sperl J. M., Sieber V. Multienzyme Cascade Reactions—Status and Recent Advances // *ACS Catalysis.* – 2018. – Vol. 8. – № 3. – P. 2385-2396.
4. France S. P., Hepworth L. J., Turner N. J., Flitsch S. L. Constructing Biocatalytic Cascades: In Vitro and in Vivo Approaches to de Novo Multi-Enzyme Pathways // *ACS Catalysis.* – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 710-724.
5. Claaßen C., Gerlach T., Rother D. Stimulus-Responsive Regulation of Enzyme Activity for One-Step and Multi-Step Syntheses // *Adv Synth Catal.* – 2019. – Vol. 361. – № 11. – P. 2387-2401.
6. Koszelewski D., Clay D., Rozzell D., Kroutil W. Deracemisation of α -Chiral Primary Amines by a One-Pot, Two-Step Cascade Reaction Catalysed by ω -Transaminases // *European Journal of Organic Chemistry.* – 2009. – Vol. 2009. – № 14. – P. 2289-2292.
7. Koszelewski D., Müller N., Joerg H. S., Faber K., Kroutil W. Immobilization of ω -transaminases by encapsulation in a sol-gel/celite matrix // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* – 2010. – Vol. 63. – № 1. – P. 39-44.
8. Sehl T., Hailes H. C., Ward J. M., Wardenga R., von Lieres E., Offermann H., Westphal R., Pohl M., Rother D. Two Steps in One Pot: Enzyme Cascade for the Synthesis of Nor(pseudo)ephedrine from Inexpensive Starting Materials // *Angewandte Chemie International Edition.* – 2013. – Vol. 52. – № 26. – P. 6772-6775.
9. Seisser B., Lavandera I., Faber K., Spelberg J. H. L., Kroutil W. Stereo-Complementary Two-Step Cascades Using a Two-Enzyme System Leading to Enantiopure Epoxides // *Advanced Synthesis & Catalysis.* – 2007. – Vol. 349. – № 8-9. – P. 1399-1404.
10. Brahma A., Musio B., Ismayilova U., Nikbin N., Kamptmann S. B., Siegert P., Jeromin G. E., Ley S. V., Pohl M. An Orthogonal Biocatalytic Approach for the Safe Generation and Use of HCN in a Multistep Continuous Preparation of Chiral α -Acetylcyanohydrins // *Synlett* – 2016. – Vol. 27. – № 2. – P. 262-266.
11. Tian T., Song Y., Wang J., Fu B., He Z., Xu X., Li A., Zhou X., Wang S. Small-Molecule-Triggered and Light-Controlled Reversible Regulation of Enzymatic Activity // *J Am Chem Soc.* – 2016. – Vol. 138. – № 3. – P. 955-61.

12. Teders M., Pogodaev A. A., Bojanov G., Huck W. T. S. Reversible Photoswitchable Inhibitors Generate Ultrasensitivity in Out-of-Equilibrium Enzymatic Reactions // *J Am Chem Soc.* – 2021. – Vol. 143. – № 15. – P. 5709-5716.
13. Teders M., Murray N. R., Huck W. T. S. Reversible Photoswitchable Inhibitors Enable Wavelength-Selective Regulation of Out-of-Equilibrium Bi-enzymatic Systems // *ChemSystemsChem.* – 2021. – Vol. 3. – № 6. – P. e2100020.
14. Bagchi D., Ghosh A., Singh P., Dutta S., Polley N., Althagafi I. I., Jassas R. S., Ahmed S. A., Pal S. K. Allosteric Inhibitory Molecular Recognition of a Photochromic Dye by a Digestive Enzyme: Dihydroindolizine makes α -chymotrypsin Photo-responsive // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 34399.
15. Pearson D., Alexander N., Abell A. D. Improved photocontrol of alpha-chymotrypsin activity: peptidomimetic trifluoromethylketone photoswitch enzyme inhibitors // *Chemistry.* – 2008. – Vol. 14. – № 24. – P. 7358-65.
16. Pearson D., Abell A. D. Photoswitch inhibitors of alpha-chymotrypsin--increased substitution and peptidic character in peptidomimetic boronate esters // *Org Biomol Chem.* – 2006. – Vol. 4. – № 19. – P. 3618-25.
17. Westmark P. R., Kelly J. P., Smith B. D. Photoregulation of enzyme activity. Photochromic, transition-state-analog inhibitors of cysteine and serine proteases // *J.Am.Chem.Soc.* – 1993. – Vol. 115. – № 9. – P. 3416–3419.
18. Harvey A. J., Abell A. D. Alpha-ketoester-based photobiological switches: synthesis, peptide chain extension and assay against alpha-chymotrypsin // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2001. – Vol. 11. – № 18. – P. 2441-4.
19. Harvey A. J., Abell A. D. Azobenzene-Containing, Peptidyl α -Ketoesters as Photobiological Switches of α -Chymotrypsin // *Tetrahedron.* – 2000. – Vol. 56. – № 50. – P. 9763-9771.
20. Díaz-Lobo M., Garcia-Amorós J., Fita I., Velasco D., Guinovart J. J., Ferrer J. C. Selective photoregulation of the activity of glycogen synthase and glycogen phosphorylase, two key enzymes in glycogen metabolism // *Org Biomol Chem.* – 2015. – Vol. 13. – № 26. – P. 7282-8.
21. Reisinger B., Kuzmanovic N., Löffler P., Merkl R., König B., Sterner R. Exploiting protein symmetry to design light-controllable enzyme inhibitors // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2014. – Vol. 53. – № 2. – P. 595-8.
22. Fujita D., Murai M., Nishioka T., Miyoshi H. Light control of mitochondrial complex I activity by a photoresponsive inhibitor // *Biochemistry.* – 2006. – Vol. 45. – № 21. – P. 6581-6.
23. Komori K., Yatagai K., Tatsuma T. Activity regulation of tyrosinase by using photoisomerizable inhibitors // *J Biotechnol.* – 2004. – Vol. 108. – № 1. – P. 11-6.

24. Vomasta D., Innocenti A., König B., Supuran C. T. Carbonic anhydrase inhibitors: two-prong versus mono-prong inhibitors of isoforms I, II, IX, and XII exemplified by photochromic cis-1,2-alpha-dithienylethene derivatives // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2009. – Vol. 19. – № 5. – P. 1283-6.
25. Vomasta D., Högner C., Branda N. R., König B. Regulation of human carbonic anhydrase I (hCAI) activity by using a photochromic inhibitor // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2008. – Vol. 47. – № 40. – P. 7644-7.
26. Shimoboji T., Larenas E., Fowler T., Hoffman A. S., Stayton P. S. Temperature-induced switching of enzyme activity with smart polymer-enzyme conjugates // *Bioconjug Chem.* – 2003. – Vol. 14. – № 3. – P. 517-25.
27. Shimoboji T., Larenas E., Fowler T., Kulkarni S., Hoffman A. S., Stayton P. S. Photoresponsive polymer-enzyme switches // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – Vol. 99. – № 26. – P. 16592-6.
28. Gu Y., Wu X., Liu H., Pan Q., Chen Y. Photoswitchable Heparinase III for Enzymatic Preparation of Low Molecular Weight Heparin // *Org Lett.* – 2018. – Vol. 20. – № 1. – P. 48-51.
29. Mizuki T., Watanabe N., Nagaoka Y., Fukushima T., Morimoto H., Usami R., Maekawa T. Activity of an enzyme immobilized on superparamagnetic particles in a rotational magnetic field // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2010. – Vol. 393. – № 4. – P. 779-82.
30. Mizuki T., Sawai M., Nagaoka Y., Morimoto H., Maekawa T. Activity of lipase and chitinase immobilized on superparamagnetic particles in a rotational magnetic field // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – № 6. – P. e66528.
31. Zakharchenko A., Guz N., Laradji A. M., Katz E., Minko S. Magnetic field remotely controlled selective biocatalysis // *Nat Catal.* – 2018. – Vol. 1. – P. 73-81.
32. Wells P. K., Smutok O., Melman A., Katz E. Switchable Biocatalytic Reactions Controlled by Interfacial pH Changes Produced by Orthogonal Biocatalytic Processes // *ACS Appl Mater Interfaces.* – 2021. – Vol. 13. – № 29. – P. 33830-33839.
33. Szekeres K., Bollella P., Kim Y., Minko S., Melman A., Katz E. Magneto-Controlled Enzyme Activity with Locally Produced pH Changes // *J Phys Chem Lett.* – 2021. – Vol. 12. – № 10. – P. 2523-2527.
34. Rifaie-Graham O., Ulrich S., Galensowske N. F. B., Balog S., Chami M., Rentsch D., Hemmer J. R., Read de Alaniz J., Boesel L. F., Bruns N. Wavelength-Selective Light-Responsive DASA-Functionalized Polymersome Nanoreactors // *J Am Chem Soc.* – 2018. – Vol. 140. – № 25. – P. 8027-8036.
35. Wahab R. A., Elias N., Abdullah F., Ghoshal S. K. On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview // *Reactive and Functional Polymers.* – 2020. – Vol. 152. –

36. Cebrián-García S., Balu A. M., García A., Luque R. Sol-Gel Immobilisation of Lipases: Towards Active and Stable Biocatalysts for the Esterification of Valeric Acid // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23. – № 9.
37. Datta S., Christena L. R., Rajaram Y. R. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials // *3 Biotech*. – 2013. – Vol. 3. – № 1. – P. 1-9.
38. Delgado-Povedano M. M., Luque de Castro M. D. A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship // *Anal Chim Acta*. – 2015. – Vol. 889. – P. 1-21.
39. *Advances in Sonochemistry*. / Lepoint T., Lepoint-Mullie F.: JAI Press, 1999. – 310 c.
40. Yu Z. L., Zeng W. C., Lu X. L. Influence of ultrasound to the activity of tyrosinase // *Ultrason Sonochem*. – 2013. – Vol. 20. – № 3. – P. 805-9.
41. Wang D., Ma X., Yan L., Chantapakul T., Wang W., Ding T., Ye X., Liu D. Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of starch catalyzed by glucoamylase: Investigation on starch properties and degradation kinetics // *Carbohydr Polym*. – 2017. – Vol. 175. – P. 47-54.
42. Ariana de Souza S., Bruno Ricardo de Castro Leite J., Pedro Esteves Duarte A., Camila Archette N., Afonso Mota R. Ultrasound processing of amyloglucosidase: impact on enzyme activity, stability and possible industrial applications // *ActaSciTechnol*. – 2021. – Vol. 43. –
43. Cebrián-García S., Balu A. M., Luque R. Ultrasound-Assisted Esterification of Valeric Acid to Alkyl Valerates Promoted by Biosilicified Lipases // *Front Chem*. – 2018. – Vol. 6. – P. 197.
44. Soares A. d. S., Leite Júnior B. R. d. C., Tribst A. A. L., Augusto P. E. D., Ramos A. M. Effect of ultrasound on goat cream hydrolysis by lipase: Evaluation on enzyme, substrate and assisted reaction // *LWT*. – 2020. – Vol. 130. –
45. Li H., Xu M., Yao X., Wen Y., Lu S., Wang J., Sun B. The promoted hydrolysis effect of cellulase with ultrasound treatment is reflected on the sonicated rather than native brown rice // *Ultrason Sonochem*. – 2022. – Vol. 83. – P. 105920.
46. Parikh D. T., Lanjekar K. J., Rathod V. K. Ultrasound-assisted lipase catalyzed synthesis of propyl caprate: Process optimization, kinetic, and thermodynamic evaluation // *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*. – 2021. – Vol. 169. –
47. Calinescu I., Vartolomei A., Gavrila I. A., Vinatoru M., Mason T. J. A reactor designed for the ultrasonic stimulation of enzymatic esterification // *Ultrason Sonochem*. – 2019. – Vol. 54. – P. 32-38.
48. Vartolomei A., Calinescu I., Vinatoru M., Gavrila A. I. A parameter study of ultrasound assisted enzymatic esterification // *Sci Rep*. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 1421.
49. Sun J., Zhang Z., Xiao F., Jin X. Production of xylooligosaccharides from corncobs using ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis // *Food Sci Biotechnol*. – 2015. – Vol. 24. – P. 2077–2081.

50. Cheng Y., Liu Y., Wu J., Ofori Donkor P., Li T., Ma H. Improving the enzymolysis efficiency of potato protein by simultaneous dual-frequency energy-gathered ultrasound pretreatment: Thermodynamics and kinetics // *Ultrason Sonochem.* – 2017. – Vol. 37. – P. 351-359.
51. Xiaobin M., Wenjun W., Mingming Z., Tian D., Xingqian Y., Donghong L. Properties and structures of commercial polygalacturonase with ultrasound treatment: role of ultrasound in enzyme activation // *RSC Advances.* – 2015. – Vol. 5. – P. 107591-107600.
52. Subhedar P. B., Gogate P. R. Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* – 2014. – Vol. 101. – P. 108-114.
53. Xia T.-T., Lin W., Liu C.-Z., Guo C. Improving catalytic activity of laccase immobilized on the branched polymer chains of magnetic nanoparticles under alternating magnetic field // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* – 2018. – Vol. 93. – № 1. – P. 88-93.
54. Liu Y., Guo C., Liu C.-Z. Enhancing the resolution of (R,S)-2-octanol catalyzed by magnetic cross-linked lipase aggregates using an alternating magnetic field // *Chemical Engineering Journal.* – 2015. – Vol. 280. – P. 36-40.
55. Poloni C., Szymanski W., Feringa B. L. Photo-controlled deactivation of immobilised lipase // *Chem Commun (Camb).* – 2014. – Vol. 50. – № 84. – P. 12645-8.
56. Agarwal P. K., Schultz C., Kalivretenos A., Ghosh B., Broedel S. E., Jr. Engineering a Hyper-catalytic Enzyme by Photoactivated Conformation Modulation // *The Journal of Physical Chemistry Letters.* – 2012. – Vol. 3. – № 9. – P. 1142-1146.
57. Schierling B., Noël A. J., Wende W., Hien I. T., Volkov E., Kubareva E., Oretskaya T., Kokkinidis M., Römpf A., Spengler B., Pingoud A. Controlling the enzymatic activity of a restriction enzyme by light // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – Vol. 107. – № 4. – P. 1361-6.
58. Yamada M. D., Nakajima Y., Maeda H., Maruta S. Photocontrol of kinesin ATPase activity using an azobenzene derivative // *J Biochem.* – 2007. – Vol. 142. – № 6. – P. 691-8.
59. Aizawa M., Namba K., Suzuki S. Photo control of enzyme activity of alpha-amylase // *Arch Biochem Biophys.* – 1977. – Vol. 180. – № 1. – P. 41-8.
60. Aizawa M., Namba K., Suzuki S. Light-induced enzyme activity changes associated with the photoisomerization of bound spiropyran // *Arch Biochem Biophys.* – 1977. – Vol. 182. – № 1. – P. 305-10.
61. Namba K., Suzuki S. PHOTO-CONTROL OF ENZYME ACTIVITY WITH A PHOTOCHROMIC SPIROPYRAN COMPOUND —MODIFICATION OF α -AMYLASE WITH SPIROPYRAN COMPOUND // *Chemistry Letters.* – 1975. – Vol. 4. – № 9. – P. 947-950.
62. Montagnoli G., Monti S., Nannicini L., Giovannitti M. P., Ristori M. G. Photomodulation of azoaldolase activity // *Photochem Photobiol.* – 1978. – Vol. 27. – № 1. – P. 43-9.

63. Karube I., Nakamoto Y., Namba K., Suzuki S. Photocontrol of urease-collagen membrane activity // *Biochim Biophys Acta*. – 1976. – Vol. 429. – № 3. – P. 975-81.
64. Erlanger B. F., Wassermann N. H., Cooper A. G., Monk R. J. Allosteric activation of the hydrolysis of specific substrates by chymotrypsin // *Eur J Biochem*. – 1976. – Vol. 61. – № 1. – P. 287-95.
65. Willner I., Rubin S., Riklin A. Photoregulation of papain activity through anchoring photochromic azo groups to the enzyme backbone // *J. Am. Chem. Soc.* – 1991. – Vol. 113. – № 9. – P. 3321–3325.
66. Lee C. T., Smith K. A., Hatton T. A. Photocontrol of protein folding: the interaction of photosensitive surfactants with bovine serum albumin // *Biochemistry*. – 2005. – Vol. 44. – № 2. – P. 524-36.
67. Wang S. C., Lee C. T. Protein secondary structure controlled with light and photoresponsive surfactants // *J Phys Chem B*. – 2006. – Vol. 110. – № 32. – P. 16117-23.
68. Wang S. C., Lee C. T. Enhanced enzymatic activity through photoreversible conformational changes // *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46. – № 50. – P. 14557-66.
69. Banik S., Bandyopadhyay S., Ganguly S. Bioeffects of microwave—a brief review // *Bioresource Technology*. – 2003. – Vol. 87. – № 2. – P. 155-159.
70. Horikoshi S., Serpone N. Microwave Flow Chemistry as a Methodology in Organic Syntheses, Enzymatic Reactions, and Nanoparticle Syntheses // *Chem Rec*. – 2019. – Vol. 19. – № 1. – P. 118-139.
71. Wang Z., Zhang Y., Zheng L., Cui X., Huang H., Geng X., Xie X. Regioselective acylation of resveratrol catalyzed by lipase under microwave // *Green Chemistry Letters and Reviews*. – 2018. – Vol. 11. – № 3. – P. 312-317.
72. Khan N. R., Rathod V. K. Microwave mediated lipase-catalyzed synthesis of n-butyl palmitate and thermodynamic studies // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2020. – Vol. 29. – P. 101741.
73. Mazinani S. A., DeLong B., Yan H. Microwave radiation accelerates trypsin-catalyzed peptide hydrolysis at constant bulk temperature // *Tetrahedron Letters*. – 2015. – Vol. 56. – № 42. – P. 5804-5807.
74. Zhang X., Cao T., Tian X., Gai D. Effect of microwave irradiation on the structure of glucoamylase // *Process Biochemistry*. – 2012. – Vol. 47. – № 12. – P. 2323-2328.
75. Shinde S. D., Yadav G. D. Insight into microwave-assisted lipase catalyzed synthesis of geranyl cinnamate: optimization and kinetic modeling // *Appl Biochem Biotechnol*. – 2015. – Vol. 175. – № 4. – P. 2035-49.

76. Yu D., Wang Y., Wang C., Ma D., Fang X. Combination use of microwave irradiation and ionic liquid in enzymatic isomerization of xylose to xylulose // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* – 2012. – Vol. 79. – P. 8-14.
77. Liu N., Wang L., Wang Z., Jiang L., Wu Z., Yue H., Xie X. Microwave-Assisted Resolution of α -Lipoic Acid Catalyzed by an Ionic Liquid Co-Lyophilized Lipase // *Molecules.* – 2015. – Vol. 20. – № 6. – P. 9949-60.
78. Rokhati N., Pramudono B., Istirokhatun T., Susanto H. Microwave Irradiation-Assisted Chitosan Hydrolysis Using Cellulase Enzyme // *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis.* – 2018. – Vol. 13. – № 3. – P. 9.
79. Meriles S. P., Steffolani M. E., Penci M. C., Curet S., Boillereaux L., Ribotta P. D. Effects of low-temperature microwave treatment of wheat germ // *J Sci Food Agric.* – 2022. – Vol. 102. – № 6. – P. 2538-2544.
80. Jaiswal K. S., Rathod V. K. Process Intensification of Enzymatic Synthesis of Flavor Esters: A Review // *Chem Rec.* – 2022. – Vol. 22. – № 3. – P. e202100213.
81. Dill L. P., Kochevka D. M., Krieger N., Ramos L. P. Synthesis of fatty acid ethyl esters with conventional and microwave heating systems using the free lipase B from *Candida antarctica* // *Biocatalysis and Biotransformation.* – 2019. – Vol. 37. – № 1. – P. 25-34.
82. Xie Z. B., Fu L. H., Meng J., Lan J., Hu Z. Y., Le Z. G. Efficient biocatalytic strategy for one-pot Biginelli reaction via enhanced specific effects of microwave in a circulating reactor // *Bioorg Chem.* – 2020. – Vol. 101. – P. 103949.
83. Bansode S. R., Rathod V. K. Enzymatic synthesis of Isoamyl butyrate under microwave irradiation // *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification.* – 2018. – Vol. 129. – P. 71-76.
84. Grossmann L., Wefers D., Bunzel M., Weiss J., Zeeb B. Accessibility of transglutaminase to induce protein crosslinking in gelled food matrices - Influence of network structure // *LWT.* – 2017. – Vol. 75. – P. 271-278.
85. Cao H., Fan D., Jiao X., Huang J., Zhao J., Yan B., Zhou W., Zhang W., Ye W., Zhang H., Chen W. Intervention of transglutaminase in surimi gel under microwave irradiation // *Food Chemistry.* – 2018. – Vol. 268. – P. 378-385.
86. Cao H., Jiao X., Fan D., Huang J., Zhao J., Yan B., Zhou W., Zhang W., Ye W., Zhang H. Catalytic effect of transglutaminase mediated by myofibrillar protein crosslinking under microwave irradiation // *Food Chem.* – 2019. – Vol. 284. – P. 45-52.
87. Harish Prashanth K. V., Tharanathan R. N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview // *Trends in Food Science & Technology.* – 2007. – Vol. 18. – № 3. – P. 117-131.

88. Huang K.-S., Wu W.-J., Chen J.-B., Lian H.-S. Application of low-molecular-weight chitosan in durable press finishing // *Carbohydrate Polymers*. – 2008. – Vol. 73. – № 2. – P. 254-260.
89. Wang F., Liu Y., Du C., Gao R. Current Strategies for Real-Time Enzyme Activation // *Biomolecules*. – 2022. – Vol. 12. – № 5.
90. Dong L. C., Hoffman A. S. Thermally reversible hydrogels: III. Immobilization of enzymes for feedback reaction control // *Journal of Controlled Release*. – 1986. – Vol. 4. – № 3. – P. 223-227.
91. Park T. G., Hoffman A. S. Immobilization and characterization of beta-galactosidase in thermally reversible hydrogel beads // *J Biomed Mater Res*. – 1990. – Vol. 24. – № 1. – P. 21-38.
92. Arica M. Y., Öktem H. A., Öktem Z., Tuncel S. A. Immobilization of catalase in poly(isopropylacrylamide-co-hydroxyethylmethacrylate) thermally reversible hydrogels // *Polymer International*. – 1999. – Vol. 48. – № 9. – P. 879-884.
93. Harada A., Johnin K., Kawamura A., Kono K. Preparation of temperature-responsive polymer gels physically immobilizing core-shell type bioconjugates // *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. – 2007. – Vol. 45. – № 24. – P. 5942-5948.
94. Klis M., Karbarz M., Stojek Z., Rogalski J., Bilewicz R. Thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide) gel for immobilization of laccase on indium tin oxide electrodes // *J Phys Chem B*. – 2009. – Vol. 113. – № 17. – P. 6062-7.
95. Welsch N., Wittemann A., Ballauff M. Enhanced activity of enzymes immobilized in thermoresponsive core-shell microgels // *J Phys Chem B*. – 2009. – Vol. 113. – № 49. – P. 16039-45.
96. Gawlitza K., Wu C., Georgieva R., Ansorge-Schumacher M., Klitzing R. v. Temperature Controlled Activity of Lipase B from *Candida Antarctica* after Immobilization within p-NIPAM Microgel Particles // *Zeitschrift für Physikalische Chemie*. – 2012. – Vol. 226. – № 7-8. – P. 749-759.
97. Bayramoglu G., Arica M. Y. Activity and stability of urease entrapped in thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-poly(ethyleneglycol)-methacrylate) hydrogel // *Bioprocess Biosyst Eng*. – 2014. – Vol. 37. – № 2. – P. 235-43.
98. Karube I., Nakamoto Y., Suzuki S. Photocontrol of urease activity in spiropyran collagen membrane // *Biochim Biophys Acta*. – 1976. – Vol. 445. – № 3. – P. 774-9.
99. Suzuki M., Aki A., Mizuki T., Maekawa T., Usami R., Morimoto H. Encouragement of Enzyme Reaction Utilizing Heat Generation from Ferromagnetic Particles Subjected to an AC Magnetic Field // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – № 5. – P. e0127673.
100. Suzuki M., Hayashi H., Mizuki T., Maekawa T., Morimoto H. Efficient DNA ligation by selective heating of DNA ligase with a radio frequency alternating magnetic field // *Biochem Biophys Rep*. – 2016. – Vol. 8. – – P. 360-364.

101. Armenia I., Grazú Bonavia M. V., De Matteis L., Ivanchenko P., Martra G., Gornati R., de la Fuente J. M., Bernardini G. Enzyme activation by alternating magnetic field: Importance of the bioconjugation methodology // *J Colloid Interface Sci.* – 2019. – Vol. 537. – P. 615-628.
102. Blankschien M. D., Pretzer L. A., Huschka R., Halas N. J., Gonzalez R., Wong M. S. Light-triggered biocatalysis using thermophilic enzyme-gold nanoparticle complexes // *ACS Nano.* – 2013. – Vol. 7. – № 1. – P. 654-63.
103. Cao Y., Wang Y. Temperature-Mediated Regulation of Enzymatic Activity // *ChemCatChem.* – 2016. – Vol. 8. – № 17. – P. 2740-2747.
104. Cao Y., Wang Z., Liao S., Wang J., Wang Y. A Light-Activated Microheater for the Remote Control of Enzymatic Catalysis // *Chemistry.* – 2016. – Vol. 22. – № 3. – P. 1152-8.
105. Miyako E., Nagata H., Hirano K., Hirotsu T. Laser-triggered carbon nanotube microdevice for remote control of biocatalytic reactions // *Lab Chip.* – 2009. – Vol. 9. – № 6. – P. 788-94.
106. Christian B. C., Christopher J. A. Remote enzyme activation using gold coated magnetite as antennae for radio frequency fields // *Colloidal Nanoparticles for Biomedical Applications XIII.* – T. 10507 – San Francisco, California, United States, 2018. – C. 105070F.
107. Takahashi F., Sakai Y., Mizutani Y. Immobilized enzyme reaction controlled by magnetic heating: γ -Fe₂O₃-loaded thermosensitive polymer gels consisting of N-isopropylacrylamide and acrylamide // *Journal of Fermentation and Bioengineering.* – 1997. – Vol. 83. – № 2. – P. 152-156.
108. Kato N., Oishi A., Takahashi F. Enzyme reaction controlled by magnetic heating due to the hysteresis loss of γ -Fe₂O₃ in thermosensitive polymer gels immobilized β -galactosidase // *Materials Science and Engineering: C.* – 1998. – Vol. 6. – № 4. – P. 291-296.
109. Marten G. U., Gelbrich T., Schmidt A. M. Hybrid biofunctional nanostructures as stimuli-responsive catalytic systems // *Beilstein J Org Chem.* – 2010. – Vol. 6. – P. 922-31.
110. Peterson M. E., Daniel R. M., Danson M. J., Eisenthal R. The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters // *Biochem J.* – 2007. – Vol. 402. – № 2. – P. 331-7.
111. Arcus V. L., Prentice E. J., Hobbs J. K., Mulholland A. J., Van der Kamp M. W., Pudney C. R., Parker E. J., Schipper L. A. On the Temperature Dependence of Enzyme-Catalyzed Rates // *Biochemistry.* – 2016. – Vol. 55. – № 12. – P. 1681-1688.
112. Meyer J., Meyer L.-E., Kara S. Enzyme immobilization in hydrogels: A perfect liaison for efficient and sustainable biocatalysis // *Engineering in Life Sciences.* – 2022. – Vol. 22. – № 3-4. – P. 165-177.
113. Sharifi M., Sohrabi M. J., Hosseinali S. H., Hasan A., Kani P. H., Talaei A. J., Karim A. Y., Nanakali N. M. Q., Salihi A., Aziz F. M., Yan B., Khan R. H., Saboury A. A., Falahati M. Enzyme

- immobilization onto the nanomaterials: Application in enzyme stability and prodrug-activated cancer therapy // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – Vol. 143. – P. 665-676.
114. da Silva R. T. P., Ribeiro de Barros H., Sandrini D. M. F., Córdoba de Torresi S. I. Stimuli-Responsive Regulation of Biocatalysis through Metallic Nanoparticle Interaction // *Bioconjugate Chemistry*. – 2022. – Vol. 33. – № 1. – P. 53-66.
115. Song Y., Chen J., Liu H., Song Y., Xu F., Tan H., Wang L. Conformation, Bioactivity and Electrochemical Performance of Glucose Oxidase Immobilized on Surface of Gold Nanoparticles // *Electrochimica Acta*. – 2015. – Vol. 158. – P. 56-63.
116. Wang L., Wang E. A novel hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized on colloidal Au modified ITO electrode // *Electrochemistry Communications*. – 2004. – Vol. 6. – № 2. – P. 225-229.
117. Luz R. A. S., Crespilho F. N. Gold nanoparticle-mediated electron transfer of cytochrome c on a self-assembled surface // *RSC Advances*. – 2016. – Vol. 6. – № 67. – P. 62585-62593.
118. Gutiérrez-Sánchez C., Pita M., Vaz-Domínguez C., Shleev S., De Lacey A. L. Gold Nanoparticles as Electronic Bridges for Laccase-Based Biocathodes // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – Vol. 134. – № 41. – P. 17212-17220.
119. Fapyane D., Ferapontova E. E. Enhanced electron transfer between gold nanoparticles and horseradish peroxidase reconstituted onto alkanethiol-modified hemin // *Electrochemistry Communications*. – 2016. – Vol. 70. – P. 39-42.
120. Zeng T., Frasca S., Rumschöttel J., Koetz J., Leimkühler S., Wollenberger U. Role of Conductive Nanoparticles in the Direct Unmediated Bioelectrocatalysis of Immobilized Sulfite Oxidase // *Electroanalysis*. – 2016. – Vol. 28. – № 10. – P. 2303-2310.
121. Frasca S., Rojas O., Salewski J., Neumann B., Stiba K., Weidinger I. M., Tiersch B., Leimkühler S., Koetz J., Wollenberger U. Human sulfite oxidase electrochemistry on gold nanoparticles modified electrode // *Bioelectrochemistry*. – 2012. – Vol. 87. – P. 33-41.
122. Sakai K., Kitazumi Y., Shirai O., Takagi K., Kano K. High-Power Formate/Dioxygen Biofuel Cell Based on Mediated Electron Transfer Type Bioelectrocatalysis // *ACS Catalysis*. – 2017. – Vol. 7. – № 9. – P. 5668-5673.
123. Monsalve K., Roger M., Gutierrez-Sanchez C., Ilbert M., Nitsche S., Byrne-Kodjabachian D., Marchi V., Lojou E. Hydrogen bioelectrooxidation on gold nanoparticle-based electrodes modified by *Aquifex aeolicus* hydrogenase: Application to hydrogen/oxygen enzymatic biofuel cells // *Bioelectrochemistry*. – 2015. – Vol. 106. – № Pt A. – P. 47-55.
124. Adachi T., Kitazumi Y., Shirai O., Kano K. Recent Progress in Applications of Enzymatic Bioelectrocatalysis // *Catalysts*. – 2020. – Vol. 10. – № 12. – P. 1413.

125. Pereira A. R., Sedenho G. C., Souza J. C. P., Crespilho F. N. Advances in enzyme bioelectrochemistry // *An Acad Bras Cienc.* – 2018. – Vol. 90. – № 1 Suppl 1. – P. 825-857.
126. Liu Y., Atanassov P. Charge transfer at biotic/abiotic interfaces in biological electrocatalysis // *Current Opinion in Electrochemistry.* – 2020. – Vol. 19. – P. 175-183.
127. Betancor L., Johnson G. R., Luckarift H. R. Stabilized Laccases as Heterogeneous Bioelectrocatalysts // *ChemCatChem.* – 2013. – Vol. 5. – № 1. – P. 46-60.
128. Zhang M., Mullens C., Gorski W. Coimmobilization of dehydrogenases and their cofactors in electrochemical biosensors // *Anal Chem.* – 2007. – Vol. 79. – № 6. – P. 2446-50.
129. Song H., Ma C., Liu P., You C., Lin J., Zhu Z. A hybrid CO₂ electroreduction system mediated by enzyme-cofactor conjugates coupled with Cu nanoparticle-catalyzed cofactor regeneration // *Journal of CO₂ Utilization.* – 2019. – Vol. 34. – P. 568-575.
130. Arana-Peña S., Carballares D., Morellon-Sterling R., Berenguer-Murcia Á., Alcántara A. R., Rodrigues R. C., Fernandez-Lafuente R. Enzyme co-immobilization: Always the biocatalyst designers' choice...or not? // *Biotechnol Adv.* – 2021. – Vol. 51. – P. 107584.
131. Reyes-De-Corcuera J. I., Olstad H. E., García-Torres R. Stability and Stabilization of Enzyme Biosensors: The Key to Successful Application and Commercialization // *Annu Rev Food Sci Technol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 293-322.
132. Wu L., Lu X., Niu K., Dhanjai, Chen J. Tyrosinase nanocapsule based nano-biosensor for ultrasensitive and rapid detection of bisphenol A with excellent stability in different application scenarios // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2020. – Vol. 165. – P. 112407.
133. Guerrieri A., Ciriello R., Bianco G., De Gennaro F., Frascaro S. Allosteric Enzyme-Based Biosensors-Kinetic Behaviours of Immobilised L-Lysine- α -Oxidase from // *Biosensors (Basel).* – 2020. – Vol. 10. – № 10.
134. Thirumalai D., Kim S., Kim S., Chang S.-C. Reagentless Amperometric Pyruvate Biosensor Based on a Prussian Blue- and Enzyme Nanoparticle-Modified Screen-Printed Carbon Electrode // *ACS Omega.* – 2020. – Vol. 5. – № 46. – P. 30123-30129.
135. Smart A., Crew A., Doran O., Hart J. P. Studies Towards the Development of a Novel, Screen-Printed Carbon-Based, Biosensor for the Measurement of Polyunsaturated Fatty Acids // *Applied Sciences.* – 2020. – Vol. 10. – № 21. – P. 7779.
136. Milton R. D., Cai R., Abdellaoui S., Leech D., De Lacey A. L., Pita M., Minter S. D. Bioelectrochemical Haber-Bosch Process: An Ammonia-Producing H₂ // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2017. – Vol. 56. – № 10. – P. 2680-2683.
137. El Ichi-Ribault S., Alcaraz J.-P., Boucher F., Boutaud B., Dalmolin R., Boutonnat J., Cinquin P., Zebda A., Martin D. K. Remote wireless control of an enzymatic biofuel cell implanted in a rabbit for 2 months // *Electrochimica Acta.* – 2018. – Vol. 269. – P. 360-366.

138. Shitanda I., Takamatsu K., Niiyama A., Mikawa T., Hoshi Y., Itagaki M., Tsujimura S. High-power lactate/O₂ enzymatic biofuel cell based on carbon cloth electrodes modified with MgO-templated carbon // *Journal of Power Sources*. – 2019. – Vol. 436. – P. 226844.
139. González-Arribas E., Aleksejeva O., Bobrowski T., Toscano M. D., Gorton L., Schuhmann W., Shleev S. Solar biosupercapacitor // *Electrochemistry Communications*. – 2017. – Vol. 74. – P. 9-13.
140. Bobrowski T., González Arribas E., Ludwig R., Toscano M. D., Shleev S., Schuhmann W. Rechargeable, flexible and mediator-free biosupercapacitor based on transparent ITO nanoparticle modified electrodes acting in μM glucose containing buffers // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2018. – Vol. 101. – P. 84-89.
141. Zhao F., Bobrowski T., Ruff A., Hartmann V., Nowaczyk M. M., Rögner M., Conzuelo F., Schuhmann W. A light-driven Nernstian biosupercapacitor // *Electrochimica Acta*. – 2019. – Vol. 306. – P. 660-666.
142. Giroud F., Sawada K., Taya M., Cosnier S. 5,5-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) pyrene derivative-carbon nanotube electrodes for NADH electrooxidation and oriented immobilization of multicopper oxidases for the development of glucose/O₂ biofuel cells // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2017. – Vol. 87. – P. 957-963.
143. Shiraiwa S., So K., Sugimoto Y., Kitazumi Y., Shirai O., Nishikawa K., Higuchi Y., Kano K. Reactivation of standard [NiFe]-hydrogenase and bioelectrochemical catalysis of proton reduction and hydrogen oxidation in a mediated-electron-transfer system // *Bioelectrochemistry*. – 2018. – Vol. 123. – P. 156-161.
144. Miyata M., Kitazumi Y., Shirai O., Kataoka K., Kano K. Diffusion-limited biosensing of dissolved oxygen by direct electron transfer-type bioelectrocatalysis of multi-copper oxidases immobilized on porous gold microelectrodes // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2020. – Vol. 860. – P. 113895.
145. Klibanov A. M., Samokhin G. P., Martinek K., Berezin I. V. Enzymatic mechanochemistry: a new approach to studying the mechanism of enzyme action // *Biochim Biophys Acta*. – 1976. – Vol. 438. – № 1. – P. 1-12.
146. Poglazov B. F., Samokhin G. P., Klibanov A. M., Levitsky D. I., Martinek K., Berezin I. V. The effect of mechanical stretching of the myosin rod component (fragment LMMMM S-2) on the ATPase activity of myosin // *Biochim Biophys Acta*. – 1978. – Vol. 524. – № 2. – P. 245-53.
147. Ishimori Y., Karube I., Suzuki S. Mechanical control of the activity of glucose oxidase immobilized on porous polyvinylchloride membrane // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1981. – Vol. 23. – № 11. – P. 2601-2608.

148. Rios C., Longo J., Zahouani S., Garnier T., Vogt C., Reisch A., Senger B., Boulmedais F., Hemmerlé J., Benmlih K., Frisch B., Schaaf P., Jierry L., Lavallo P. A new biomimetic route to engineer enzymatically active mechano-responsive materials // *Chem Commun (Camb)*. – 2015. – Vol. 51. – № 26. – P. 5622-5.
149. Рубинский А. В., Власов Т. Д., Чалисова Н. И. Модель для изучения действия магнитных полей на биологические объекты (в рамках проекта «Российский маглев») // *Сетевой электронный журнал "Транспортные системы и технологии"*. – 2018.10.17816/transsyst201843s1340-350. – P. 340-350.
150. Panagopoulos D. J., Karabarbounis A., Yakymenko I., Chrousos G. P. Human-made electromagnetic fields: Ion forced-oscillation and voltage-gated ion channel dysfunction, oxidative stress and DNA damage (Review) // *Int J Oncol*. – 2021. – Vol. 59. – № 5.
151. Pophof B., Henschenmacher B., Kattinig D. R., Kuhne J., Vian A., Ziegelberger G. Biological Effects of Electric, Magnetic, and Electromagnetic Fields from 0 to 100 MHz on Fauna and Flora: Workshop Report // *Health Phys*. – 2023. – Vol. 124. – № 1. – P. 39-52.
152. Crumpton M. J. The Bernal Lecture 2004 Are low-frequency electromagnetic fields a health hazard? // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. – 2005. – Vol. 360. – № 1458. – P. 1223-30.
153. Lacy-Hulbert A., Metcalfe J. C., Hesketh R. Biological responses to electromagnetic fields // *FASEB J*. – 1998. – Vol. 12. – № 6. – P. 395-420.
154. Buchachenko A. L., Kouznetsov D. A., Orlova M. A., Markarian A. A. Magnetic isotope effect of magnesium in phosphoglycerate kinase phosphorylation // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2005. – Vol. 102. – № 31. – P. 10793-6.
155. Buchachenko A. L., Kuznetsov D. A. Magnetic field affects enzymatic ATP synthesis // *J Am Chem Soc*. – 2008. – Vol. 130. – № 39. – P. 12868-9.
156. Buchachenko A. L., Kouznetsov D. A., Breslavskaya N. N., Orlova M. A. Magnesium isotope effects in enzymatic phosphorylation // *J Phys Chem B*. – 2008. – Vol. 112. – № 8. – P. 2548-56.
157. Buchachenko A. L., Kuznetsov D. A., Breslavskaya N. N. Ion-radical mechanism of enzymatic ATP synthesis: DFT calculations and experimental control // *J Phys Chem B*. – 2010. – Vol. 114. – № 6. – P. 2287-92.
158. Rodgers C. T. Magnetic field effects in chemical systems // *Pure and Applied Chemistry*. – 2009. – Vol. 81. – № 1. – P. 19-43.
159. Crotty D., Silkstone G., Poddar S., Ranson R., Prina-Mello A., Wilson M. T., Coey J. M. Reexamination of magnetic isotope and field effects on adenosine triphosphate production by creatine kinase // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2012. – Vol. 109. – № 5. – P. 1437-42.

160. MA H., HUANG L., ZHU C. THE EFFECT OF PULSED MAGNETIC FIELD ON HORSERADISH PEROXIDASE // *Journal of Food Process Engineering*. – 2011. – Vol. 34. – № 5. – P. 1609-1622.
161. Portaccio M., De Luca P., Durante D., Rossi S., Bencivenga U., Canciglia P., Lepore M., Mattei A., De Maio A., Mita D. G. In vitro studies of the influence of ELF electromagnetic fields on the activity of soluble and insoluble peroxidase // *Bioelectromagnetics*. – 2003. – Vol. 24. – № 7. – P. 449-56.
162. Caliga R., Maniu C. L., Mihășan M. ELF-EMF exposure decreases the peroxidase catalytic efficiency in vitro // *Open Life Sciences*. – 2016. – Vol. 11. – № 1. – P. 71-77.
163. Murayama S., Ishizuka F., Takagi K., Inoda H., Sano A., Santa T., Kato M. Small mesh size hydrogel for functional photocontrol of encapsulated enzymes and small probe molecules // *Anal Chem*. – 2012. – Vol. 84. – № 3. – P. 1374-9.
164. Shi P., Ju E., Ren J., Qu X. Near-Infrared Light-Encoded Orthogonally Triggered and Logical Intracellular Release Using Gold Nanocage@Smart Polymer Shell // *Advanced Functional Materials*. – 2014. – Vol. 24. – № 6. – P. 826-834.
165. Yavuz M. S., Cheng Y., Chen J., Cobley C. M., Zhang Q., Rycenga M., Xie J., Kim C., Song K. H., Schwartz A. G., Wang L. V., Xia Y. Gold nanocages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light // *Nat Mater*. – 2009. – Vol. 8. – № 12. – P. 935-9.
166. Hindley J. W., Elani Y., McGilvery C. M., Ali S., Bevan C. L., Law R. V., Ces O. Light-triggered enzymatic reactions in nested vesicle reactors // *Nat Commun*. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 1093.
167. Vlasova K. Y., Vishwasrao H., Abakumov M. A., Golovin D. Y., Gribanovsky S. L., Zhigachev A. O., Poloznikov A., Majouga A. G., Golovin Y. I., Sokolsky-Papkov M., Klyachko N. L., Kabanov A. V. Enzyme Release from Polyion Complex by Extremely Low Frequency Magnetic Field // *Sci Rep*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 4745.
168. Vlasova K. Y., Vanzarakshaeva S. C., Veselov M. M., Le-Deygen I. M., Petrunin A. V., Prusov A. N., Shuklinov A. B., Golovin Y. I., Kabanov A. V., Klyachko N. L. Magnetic Liposomes for Remote Controlled High-Molecular Drugs Release under a Low-Frequency Non-Heating Magnetic Field // *Moscow University Chemistry Bulletin*. – 2020. – Vol. 75. – № 4. – P. 232-237.
169. Silanskas A., Foss M., Wende W., Urbanke C., Lagunavicius A., Pingoud A., Siksnyš V. Photocaged variants of the MunI and PvuII restriction enzymes // *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 50. – № 14. – P. 2800-7.
170. Silanskas A., Zaremba M., Sasnauskas G., Siksnyš V. Catalytic activity control of restriction endonuclease--triplex forming oligonucleotide conjugates // *Bioconjug Chem*. – 2012. – Vol. 23. – № 2. – P. 203-11.

171. Endo M., Nakayama K., Majima T. Design and synthesis of photochemically controllable restriction endonuclease BamHI by manipulating the salt-bridge network in the dimer interface // *J Org Chem.* – 2004. – Vol. 69. – № 13. – P. 4292-8.
172. Zou K., Cheley S., Givens R. S., Bayley H. Catalytic subunit of protein kinase A caged at the activating phosphothreonine // *J Am Chem Soc.* – 2002. – Vol. 124. – № 28. – P. 8220-9.
173. Takamori S., Yamaguchi S., Ohashi N., Nagamune T. Sterically bulky caging for light-inducible protein activation // *Chem Commun (Camb).* – 2013. – Vol. 49. – № 29. – P. 3013-5.
174. Chou C., Young D. D., Deiters A. Photocaged t7 RNA polymerase for the light activation of transcription and gene function in pro- and eukaryotic cells // *Chembiochem.* – 2010. – Vol. 11. – № 7. – P. 972-7.
175. Kohse S., Neubauer A., Lochbrunner S., Kragl U. Improving the Time Resolution for Remote Control of Enzyme Activity by a Nanosecond Laser-Induced pH Jump // *ChemCatChem.* – 2014. – Vol. 6. – № 12. – P. 3511-3517.
176. Kohse S., Neubauer A., Pazidis A., Lochbrunner S., Kragl U. Photoswitching of enzyme activity by laser-induced pH-jump // *J Am Chem Soc.* – 2013. – Vol. 135. – № 25. – P. 9407-11.
177. Martin C. J., Rapenne G., Nakashima T., Kawai T. Recent progress in development of photoacid generators // *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews.* – 2018. – Vol. 34. – P. 41-51.
178. Thompson S. A., Paterson S., Azab M. M. M., Wark A. W., de la Rica R. Light-Triggered Inactivation of Enzymes with Photothermal Nanoheaters // *Small.* – 2017. – Vol. 13. – № 15. – P. 1603195.
179. Hüttmann G., Radt B., Serbin J., Birngruber R. Inactivation of proteins by irradiation of gold nanoparticles with nano-and picosecond laser pulses // *Therapeutic Laser Applications and Laser-Tissue Interactions / Под ред. Steiner R.* – Т. 5142: Proc. SPIE – Munich: Optica Publishing Group, 2003. – С. 5142_88.
180. Kang P., Chen Z., Nielsen S. O., Hoyt K., D'Arcy S., Gassensmith J. J., Qin Z. Molecular Hyperthermia: Spatiotemporal Protein Unfolding and Inactivation by Nanosecond Plasmonic Heating // *Small.* – 2017. – Vol. 13. – № 36. – P. 1700841.
181. Liao J. C., Roeder J., Jay D. G. Chromophore-assisted laser inactivation of proteins is mediated by the photogeneration of free radicals // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1994. – Vol. 91. – № 7. – P. 2659-63.
182. Abrahamse H., Hamblin M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy // *Biochem J.* – 2016. – Vol. 473. – № 4. – P. 347-64.

183. Bulina M. E., Lukyanov K. A., Britanova O. V., Onichtchouk D., Lukyanov S., Chudakov D. M. Chromophore-assisted light inactivation (CALI) using the phototoxic fluorescent protein KillerRed // *Nat Protoc.* – 2006. – Vol. 1. – № 2. – P. 947-53.
184. Jacobson K., Rajfur Z., Vitriol E., Hahn K. Chromophore-assisted laser inactivation in cell biology // *Trends Cell Biol.* – 2008. – Vol. 18. – № 9. – P. 443-50.
185. Morton R. A., Luo G., Davis M. I., Hales T. G., Lovinger D. M. Fluorophore assisted light inactivation (FALI) of recombinant 5-HT₃A receptor constitutive internalization and function // *Mol Cell Neurosci.* – 2011. – Vol. 47. – № 2. – P. 79-92.
186. Takemoto K., Matsuda T., McDougall M., Klaubert D. H., Hasegawa A., Los G. V., Wood K. V., Miyawaki A., Nagai T. Chromophore-assisted light inactivation of HaloTag fusion proteins labeled with eosin in living cells // *ACS Chem Biol.* – 2011. – Vol. 6. – № 5. – P. 401-6.
187. Tour O., Meijer R. M., Zacharias D. A., Adams S. R., Tsien R. Y. Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation // *Nat Biotechnol.* – 2003. – Vol. 21. – № 12. – P. 1505-8.
188. Jay D. G. Selective destruction of protein function by chromophore-assisted laser inactivation // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1988. – Vol. 85. – № 15. – P. 5454-8.
189. Linden K. G., Liao J. C., Jay D. G. Spatial specificity of chromophore assisted laser inactivation of protein function // *Biophys J.* – 1992. – Vol. 61. – № 4. – P. 956-62.
190. Surrey T., Elowitz M. B., Wolf P. E., Yang F., Nédélec F., Shokat K., Leibler S. Chromophore-assisted light inactivation and self-organization of microtubules and motors // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – Vol. 95. – № 8. – P. 4293-8.
191. Beck S., Sakurai T., Eustace B. K., Beste G., Schier R., Rudert F., Jay D. G. Fluorophore-assisted light inactivation: a high-throughput tool for direct target validation of proteins // *Proteomics.* – 2002. – Vol. 2. – № 3. – P. 247-55.
192. Endres S., Wingen M., Torra J., Ruiz-González R., Polen T., Bosio G., Bitzenhofer N. L., Hilgers F., Gensch T., Nonell S., Jaeger K. E., Drepper T. An optogenetic toolbox of LOV-based photosensitizers for light-driven killing of bacteria // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 15021.
193. Mayer G., Heckel A. Biologically active molecules with a "light switch" // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2006. – Vol. 45. – № 30. – P. 4900-21.
194. Longo J., Yao C., Rios C., Chau N. T., Boulmedais F., Hemmerlé J., Lavallo P., Schiller S. M., Schaaf P., Jierry L. Reversible biomechano-responsive surface based on green fluorescent protein genetically modified with unnatural amino acids // *Chem Commun (Camb).* – 2015. – Vol. 51. – № 1. – P. 232-5.
195. Hughes M. L., Dougan L. The physics of pulling polyproteins: a review of single molecule force spectroscopy using the AFM to study protein unfolding // *Rep Prog Phys.* – 2016. – Vol. 79. – № 7. – P. 076601.

196. Jiao J., Rebane A. A., Ma L., Zhang Y. Single-Molecule Protein Folding Experiments Using High-Precision Optical Tweezers // *Methods Mol Biol.* – 2017. – Vol. 1486. – P. 357-390.
197. Puchner E. M., Alexandrovich A., Kho A. L., Hensen U., Schäfer L. V., Brandmeier B., Gräter F., Grubmüller H., Gaub H. E., Gautel M. Mechanoenzymatics of titin kinase // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – Vol. 105. – № 36. – P. 13385-90.
198. Guo Q., He Y., Lu H. P. Interrogating the activities of conformational deformed enzyme by single-molecule fluorescence-magnetic tweezers microscopy // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2015. – Vol. 112. – № 45. – P. 13904-9.
199. Pal N., Wu M., Lu H. P. Probing conformational dynamics of an enzymatic active site by an in situ single fluorogenic probe under piconewton force manipulation // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2016. – Vol. 113. – № 52. – P. 15006-15011.
200. Klyachko N. L., Sokolsky-Papkov M., Pothayee N., Efremova M. V., Gulin D. A., Kuznetsov A. A., Majouga A. G., Riffle J. S., Golovin Y. I., Kabanov A. V. Changing the enzyme reaction rate in magnetic nanosuspensions by a non-heating magnetic field // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2012. – Vol. 51. – № 48. – P. 12016-9.
201. Golovin Y. I., Gribovskii S. L., Golovin D. Y., Klyachko N. L., Kabanov A. V. Single-domain magnetic nanoparticles in an alternating magnetic field as mediators of local deformation of the surrounding macromolecules // *Phys. Solid State.* – 2014. – Vol. 56. –
202. Golovin Y. I., Klyachko N. L., Golovin D. Y., Efremova M. V., Samodurov A. A., Sokolski-Papkov M., Kabanov A. V. A new approach to the control of biochemical reactions in a magnetic nanosuspension using a low-frequency magnetic field // *Tech. Phys. Lett.* – 2013. – Vol. 39. – P. 240-243.
203. Ha T. Single-molecule FRET Studies of Helicases and Holliday Junctions // *Single Molecule Dynamics in Life Science, 2008.* – C. 257-275.
204. Handbook of molecular force spectroscopy. / Noy A. – New York: Springer, 2008.
205. Hoffmann T., Dougan L. Single molecule force spectroscopy using polyproteins // *Chem Soc Rev.* – 2012. – Vol. 41. – № 14. – P. 4781-96.
206. Golovin Y. I., Gribovskiy S. L., Golovin D. Y., Klyachko N. L., Majouga A. G., Master A M., Sokolsky M., Kabanov A. V. Towards nanomedicines of the future: Remote magneto-mechanical actuation of nanomedicines by alternating magnetic fields // *J Control Release.* – 2015. – Vol. 219. – P. 43-60.
207. Bañobre-López M., Piñeiro, Y., López-Quintela, M. A., & Rivas, J. Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications // *Handbook of Nanomaterials Properties / Zauscher B. B. D. L. S. R. S. W. S. S.* – Berlin: Springer, 2014. – C. 457-493.

208. Golovin Y. I., Klyachko N. L., Majouga A. G., Sokolsky M., Kabanov A. V. Theranostic multimodal potential of magnetic nanoparticles actuated by non-heating low frequency magnetic field in the new-generation nanomedicine // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2017. – Vol. 19. – № 63.
209. Creixell M., Bohórquez A. C., Torres-Lugo M., Rinaldi C. EGFR-targeted magnetic nanoparticle heaters kill cancer cells without a perceptible temperature rise // *ACS Nano*. – 2011. – Vol. 5. – № 9. – P. 7124-9.
210. Amstad E., Kohlbrecher J., Müller E., Schweizer T., Textor M., Reimhult E. Triggered release from liposomes through magnetic actuation of iron oxide nanoparticle containing membranes // *Nano Lett.* – 2011. – Vol. 11. – № 4. – P. 1664-70.
211. Peiris P. M., Bauer L., Toy R., Tran E., Pansky J., Doolittle E., Schmidt E., Hayden E., Mayer A., Keri R. A., Griswold M. A., Karathanasis E. Enhanced delivery of chemotherapy to tumors using a multicomponent nanochain with radio-frequency-tunable drug release // *ACS Nano*. – 2012. – Vol. 6. – № 5. – P. 4157-68.
212. Burmistrov I. A., Veselov M. M., Mikheev A. V., Borodina T. N., Bukreeva T. V., Chuev M. A., Starchikov S. S., Lyubutin I. S., Artemov V. V., Khmelenin D. N., Klyachko N. L., Trushina D. B. Permeability of the Composite Magnetic Microcapsules Triggered by a Non-Heating Low-Frequency Magnetic Field // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 14. – № 1.
213. Le-Deygen I. M., Vlasova K. Y., Kutsenok E. O., Usvaliev A. D., Efremova M. V., Zhigachev A. O., Rudakovskaya P. G., Golovin D. Y., Gribovsky S. L., Kudryashova E. V., Majouga A. G., Golovin Y. I., Kabanov A. V., Klyachko N. L. Magnetic nanorods for remote disruption of lipid membranes by non-heating low frequency magnetic field // *Nanomedicine*. – 2019. – Vol. 21. – P. 102065.
214. Vlasova K. Y., Piroyan A., Le-Deygen I. M., Vishwasrao H. M., Ramsey J. D., Klyachko N. L., Golovin Y. I., Rudakovskaya P. G., Kireev I. I., Kabanov A. V., Sokolsky-Papkov M. Magnetic liposome design for drug release systems responsive to super-low frequency alternating current magnetic field (AC MF) // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2019. – Vol. 552. – P. 689-700.
215. Kladko D. V., Zakhazhevskii M. A., Vinogradov V. V. Magnetic Field-Mediated Control of Whole-Cell Biocatalysis // *J Phys Chem Lett*. – 2020. – Vol. 11. – № 21. – P. 8989-8996.
216. Gregurec D., Senko A. W., Chuvilin A., Reddy P. D., Sankararaman A., Rosenfeld D., Chiang P. H., Garcia F., Tafel I., Varnavides G., Ciocan E., Anikeeva P. Magnetic Vortex Nanodiscs Enable Remote Magnetomechanical Neural Stimulation // *ACS Nano*. – 2020. – Vol. 14. – № 7. – P. 8036-8045.
217. Yu Y., Payne C., Marina N., Korsak A., Southern P., García-Prieto A., Christie I. N., Baker R. R., Fisher E. M. C., Wells J. A., Kalber T. L., Pankhurst Q. A., Gourine A. V., Lythgoe M. F. Remote and

- Selective Control of Astrocytes by Magnetomechanical Stimulation // *Adv Sci (Weinh)*. – 2022. – Vol. 9. – № 6. – P. e2104194.
218. Lin S., Li J., Shao J., Zhang J., He X., Huang D., Dong L., Lin J., Weng W., Cheng K. Anisotropic magneto-mechanical stimulation on collagen coatings to accelerate osteogenesis // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2022. – Vol. 210. – P. 112227.
219. Hu B., El Haj A. J., Dobson J. Receptor-targeted, magneto-mechanical stimulation of osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *Int J Mol Sci*. – 2013. – Vol. 14. – № 9. – P. 19276-93.
220. Majouga A., Sokolsky-Papkov M., Kuznetsov A., Lebedev D., Efremova M., Beloglazkina E., Rudakovskaya P., Veselov M., Zyk N., Golovin Y., Klyachko N., Kabanov A. Enzyme-functionalized gold-coated magnetite nanoparticles as novel hybrid nanomaterials: synthesis, purification and control of enzyme function by low-frequency magnetic field // *Colloids Surf B Biointerfaces*. – 2015. – Vol. 125. – P. 104-9.
221. Ефремова М. В. Синтез, физико-химические свойства и биомедицинское применение гибридных материалов на основе наночастиц магнетит-золото / МГУ им. М.В. Ломоносова. – Москва, 2018.
222. Efremova M. V., Veselov M. M., Barulin A. V., Gribanovsky S. L., Le-Deygen I. M., Uporov I. V., Kudryashova E. V., Sokolsky-Papkov M., Majouga A. G., Golovin Y. I., Kabanov A. V., Klyachko N. L. In Situ Observation of Chymotrypsin Catalytic Activity Change Actuated by Nonheating Low-Frequency Magnetic Field // *ACS Nano*. – 2018. – Vol. 12. – № 4. – P. 3190-3199.
223. Shafiq Z., Cui J., Pastor-Pérez L., San Miguel V., Gropeanu R. A., Serrano C., del Campo A. Bioinspired underwater bonding and debonding on demand // *Angew Chem Int Ed Engl*. – 2012. – Vol. 51. – № 18. – P. 4332-5.
224. Stookey L. L. Ferrozine---a new spectrophotometric reagent for iron // *Analytical Chemistry*. – 1970. – Vol. 42. – № 7. – P. 779-781.
225. Achstetter T., Ehmann C., Wolf D. H. New proteolytic enzymes in yeast // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1981. – Vol. 207. – № 2. – P. 445-454.
226. Veskokoukis A. S., Margaritelis N. V., Kyparos A., Paschalis V., Nikolaidis M. G. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood and tissues: the NADPH network // *Redox Report*. – 2018. – Vol. 23. – № 1. – P. 47-56.
227. Venyaminov S., Kalnin N. N. Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands // *Biopolymers*. – 1990. – Vol. 30. – № 13-14. – P. 1243-57.

228. Cardoso V. F., Irusta S., Navascues N., Lanceros-Mendez S. Comparative study of sol-gel methods for the facile synthesis of tailored magnetic silica spheres // *Materials Research Express*. – 2016. – Vol. 3. – № 7. – P. 075402.
229. Mahato K., Nagpal S., Shah M. A., Srivastava A., Maurya P. K., Roy S., Jaiswal A., Singh R., Chandra P. Gold nanoparticle surface engineering strategies and their applications in biomedicine and diagnostics // *3 Biotech*. – 2019. – Vol. 9. – № 2. – P. 57.
230. Sawatzky G. A., Van Der Woude F., Morrish A. H. Recoilless-Fraction Ratios for Fe⁵⁷ in Octahedral and Tetrahedral Sites of a Spinel and a Garnet // *Physical Review*. – 1969. – Vol. 183. – № 2. – P. 383-386.
231. Voleník K., Seberíni M., Neid J. A Mössbauer and X-ray diffraction study of nonstoichiometry in magnetite // *Czechoslovak Journal of Physics B*. – 1975. – Vol. 25. – P. 1063-1071.
232. Mørup S., Topsøe H. Mössbauer studies of thermal excitations in magnetically ordered microcrystals // *Appl. Phys*. – 1976. – Vol. 11. – P. 63-66.
233. Demchenko P., Nedelko N., Mitina N., Lewińska S., Dłużewski P., Greneche J. M., Ubizskii S., Navrotskyi S., Zaichenko A., Ślawska-Waniewska A. Collective magnetic behavior of biocompatible systems of maghemite particles coated with functional polymer shells // *JMMM*. – 2015. – Vol. 379. – P. 28-38.
234. Golovin Y. I., Gribovsky S. L., Golovin D. Y., Zhigachev A. O., Klyachko N. L., Majouga A. G., Sokolsky M., Kabanov A. V. The dynamics of magnetic nanoparticles exposed to non-heating alternating magnetic field in biochemical applications: theoretical study // *Journal of Nanoparticles Research*. – 2017. – Vol. 19. – № 59.
235. Yang H., Yang S., Kong J., Dong A., Yu S. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy // *Nat Protoc*. – 2015. – Vol. 10. – № 3. – P. 382-96.
236. Vinogradov A. A., Kudryashova E. V., Grinberg V. Y., Grinberg N. V., Burova T. V., Levashov A. V. The chemical modification of alpha-chymotrypsin with both hydrophobic and hydrophilic compounds stabilizes the enzyme against denaturation in water-organic media // *Protein Eng*. – 2001. – Vol. 14. – № 9. – P. 683-9.
237. Naganathan A. N., Muñoz V. Scaling of folding times with protein size // *J Am Chem Soc*. – 2005. – Vol. 127. – № 2. – P. 480-1.
238. Ivankov D. N., Finkelstein A. V. Prediction of protein folding rates from the amino acid sequence-predicted secondary structure // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2004. – Vol. 101. – № 24. – P. 8942-4.
239. Duda C. T., Light A. Refolding of bovine threonine-neochymotrypsinogen // *J Biol Chem*. – 1982. – Vol. 257. – № 16. – P. 9866-71.

240. Bender M. L., Kézdy F. J., Wedler F. C. Alpha-chymotrypsin: enzyme concentration and kinetics // *J Chem Educ.* – 1967. – Vol. 44. – № 2. – P. 84-8.
241. *Relaxation Phenomena.* / Haase W., Wróbel S.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003.
242. Tsu C. A., Perona J. J., Schellenberger V., Turck C. W., Craik C. S. The substrate specificity of Uca pugilator collagenolytic serine protease 1 correlates with the bovine type I collagen cleavage sites // *J Biol Chem.* – 1994. – Vol. 269. – № 30. – P. 19565-72.
243. Chung-Shu Wu C.-T. W., Yuh-Shyong Yang, Fu-Hsiang Ko. An enzymatic kinetics investigation into the significantly enhanced activity of functionalized gold nanoparticles // *Chem. Commun.* – 2008. № 42. – P. 5327-5329.
244. You C.-C., Agasti S. S., De M., Knapp M. J., Rotello V. M. Modulation of the Catalytic Behavior of α -Chymotrypsin at Monolayer-Protected Nanoparticle Surfaces // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 128. – № 45. – P. 14612–14618.
245. Pandey P., Singh S. P., Arya S. K., Gupta V., Datta M., Singh S., Malhotra B. D. Application of Thiolated Gold Nanoparticles for the Enhancement of Glucose Oxidase Activity // *Langmuir.* – 2007. – Vol. 23. – № 6. – P. 3333–3337.
246. Guo Q., He Y., Lu H. P. Manipulating and probing enzymatic conformational fluctuations and enzyme-substrate interactions by single-molecule FRET-magnetic tweezers microscopy // *Phys Chem Chem Phys.* – 2014. – Vol. 16. – № 26. – P. 13052-8.
247. Weng Y. Z., Chang D. T., Huang Y. F., Lin C. W. A study on the flexibility of enzyme active sites // *BMC Bioinformatics.* – 2011. – Vol. 12 Suppl 1. – P. S32.
248. James M. N., Sielecki A., Salituro F., Rich D. H., Hofmann T. Conformational flexibility in the active sites of aspartyl proteinases revealed by a pepstatin fragment binding to penicillopepsin // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1982. – Vol. 79. – № 20. – P. 6137-41.
249. Saranya N., Selvaraj S. Variation of protein binding cavity volume and ligand volume in protein-ligand complexes // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2009. – Vol. 19. – № 19. – P. 5769-72.
250. Nemukhin A. V., Gariev I. A., Rogov A. V., Varfolomeev S. D. Serine hydrolase catalytic sites : geometry invariants and modeling catalytic activity // *Mendeleev Communication.* – 2006. – Vol. 16. – № 6. – P. 290-292.
251. Golovin Y. I., Klyachko N. L., Majouga A. G., Gribovskii S. L., Golovin D. Y., Zhigachev A. O., Shuklinov A. V., Efremova M. V., Veselov M. M., Vlasova K. Y., Usvaliev A. D., Le-Deygen I. M., Kabanov A. V. New Approaches to Nanotheranostics: Polyfunctional Magnetic Nanoparticles Activated by Non-Heating Low-Frequency Magnetic Field Control Biochemical System with Molecular Locality and Selectivity // *Nanotechnol Russia.* – 2018. – Vol. 13. – P. 215-239.

252. Bornadel A., Hatti-Kaul R., Hollmann F., Kara S. A Bi-enzymatic Convergent Cascade for ϵ -Caprolactone Synthesis Employing 1,6-Hexanediol as a 'Double-Smart Cosubstrate' // *ChemCatChem*. – 2015. – Vol. 7. – № 16. – P. 2442-2445.
253. Martínez-Montero L., Gotor V., Gotor-Fernández V., Lavandera I. But-2-ene-1,4-diamine and But-2-ene-1,4-diol as Donors for Thermodynamically Favored Transaminase- and Alcohol Dehydrogenase-Catalyzed Processes // *Advanced Synthesis & Catalysis*. – 2016. – Vol. 358. – № 10. – P. 1618-1624.
254. Díaz-Rodríguez A., Borzęcka W., Lavandera I., Gotor V. Stereodivergent Preparation of Valuable γ - or δ -Hydroxy Esters and Lactones through One-Pot Cascade or Tandem Chemoenzymatic Protocols // *ACS Catalysis*. – 2014. – Vol. 4. – № 2. – P. 386-393.
255. Paul C. E., Lavandera I., Gotor-Fernández V., Kroutil W., Gotor V. *Escherichia coli*/ADH-A: An All-Inclusive Catalyst for the Selective Biooxidation and Deracemisation of Secondary Alcohols // *ChemCatChem*. – 2013. – Vol. 5. – № 12. – P. 3875-3881.
256. Kara S., Schrittwieser J. H., Gargiulo S., Ni Y., Yanase H., Opperman D. J., van Berkel W. J. H., Hollmann F. Complete Enzymatic Oxidation of Methanol to Carbon Dioxide: Towards More Eco-Efficient Regeneration Systems for Reduced Nicotinamide Cofactors // *Advanced Synthesis & Catalysis*. – 2015. – Vol. 357. – № 8. – P. 1687-1691.
257. D. Mehn, F. Caputo, M. Rösslein, L. Calzolari, F. Saint-Antonin, T. Courant, Wick P., Gilliland D. Larger or more? Nanoparticle characterisation methods for recognition of dimers // *RSC Advances*. – 2017. – Vol. 7. – № 44. – P. 27747-27754.
258. *The World of Nano-Biomechanics*. / Ikai A.: Elsevier B.V., 2008.
259. *Single Molecule Dynamics in Life Science*. / Yanagida T., Ishii Y. – Weinheim: Wiley-VCH, 2008.
260. Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells // *Acta Biomater*. – 2007. – Vol. 3. – № 4. – P. 413-38.

ПРИЛОЖЕНИЕ

П.1 Деконволюция полосы Амид I ИК-спектров

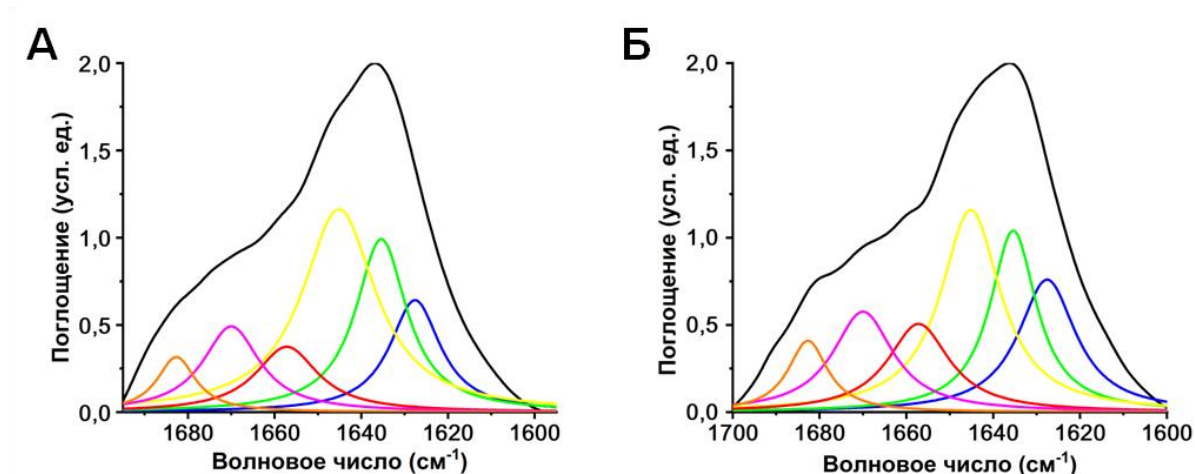


Рисунок S 1. Деконволюция полосы Амид I ИК-спектра нативного ХТ (А) до и (Б) сразу после воздействия трех циклов «пульсирующего» НЧПМП ($f = 50$ Гц, $B = 140$ мТл, Пульс/Пауза = 1 мин/30 с). Спектры нормализованы. Концентрация ХТ 0,5 мг/мл, 20 мМ цитратный буфер (рН 4,5), 22°C. Экспериментальный спектр показан черным. Цветными линиями показаны кривые симуляций, соответствующие α -спиралям (красный), β -листам (голубой и зеленый), β -складкам (фиолетовый и оранжевый) и неупорядоченной структуре (желтый).

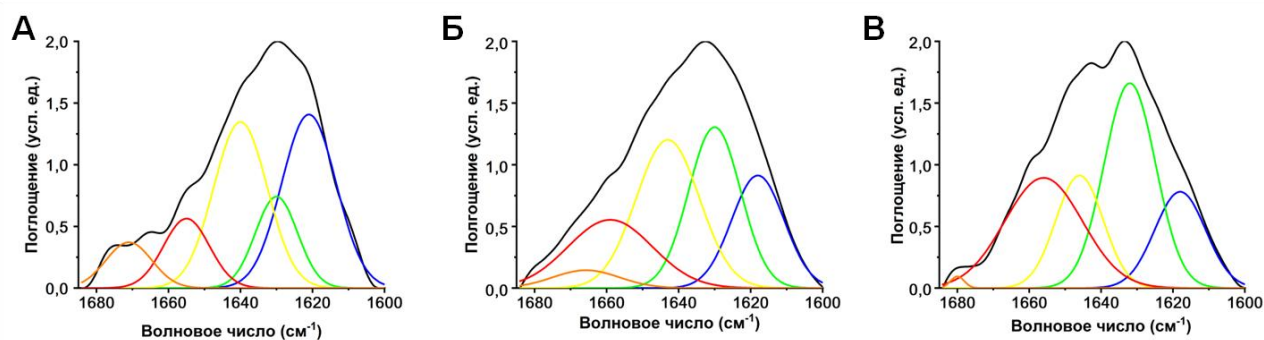


Рисунок S 2. Деконволюция полосы Амид I ИК-спектра МНЧ-ЛК-ХТ (А) до, (Б) сразу после и (В) через 3 часа после воздействия трех циклов «пульсирующего» НЧПМП ($f = 50$ Гц, $B = 140$ мТл, Пульс/Пауза = 1 мин/30 с). Образцы были сконцентрированы в 20 раз после синтеза. Остальные условия эксперимента и цветовая кодировка кривых такие же как на рисунке S 1.

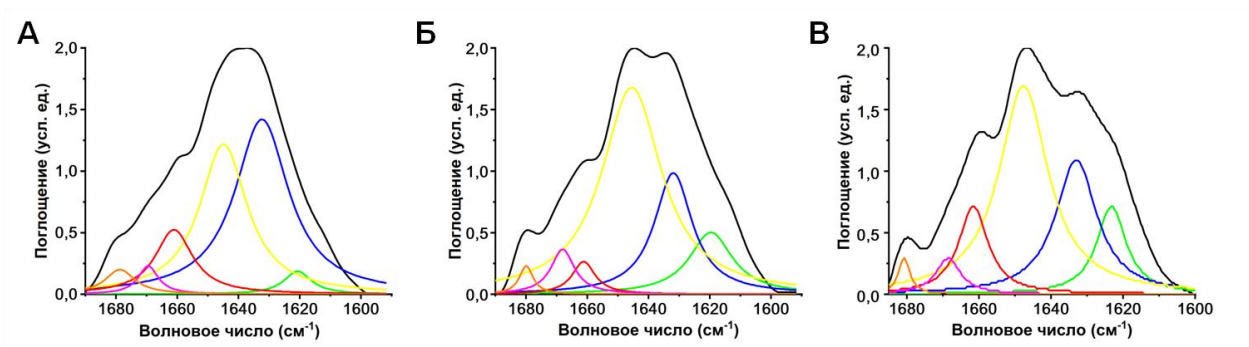


Рисунок S 3. Деконволюция полосы Амид I ИК-спектра МНЧ-ЦА-ХТ (А) до, (Б) сразу после и (В) через 3 часа после воздействия трех циклов «пульсирующего» НЧПМП ($f = 50$ Гц, $B = 140$ мТл, Пульс/Пауза = 1 мин/30 с). Образцы были сконцентрированы в 20 раз после синтеза. Остальные условия эксперимента и цветовая кодировка кривых такие же как на рисунке S 1.

П. 2 Данные NTA для агрегатов типа МНЧ-АДГ-МНЧ (образцы D1-D4)

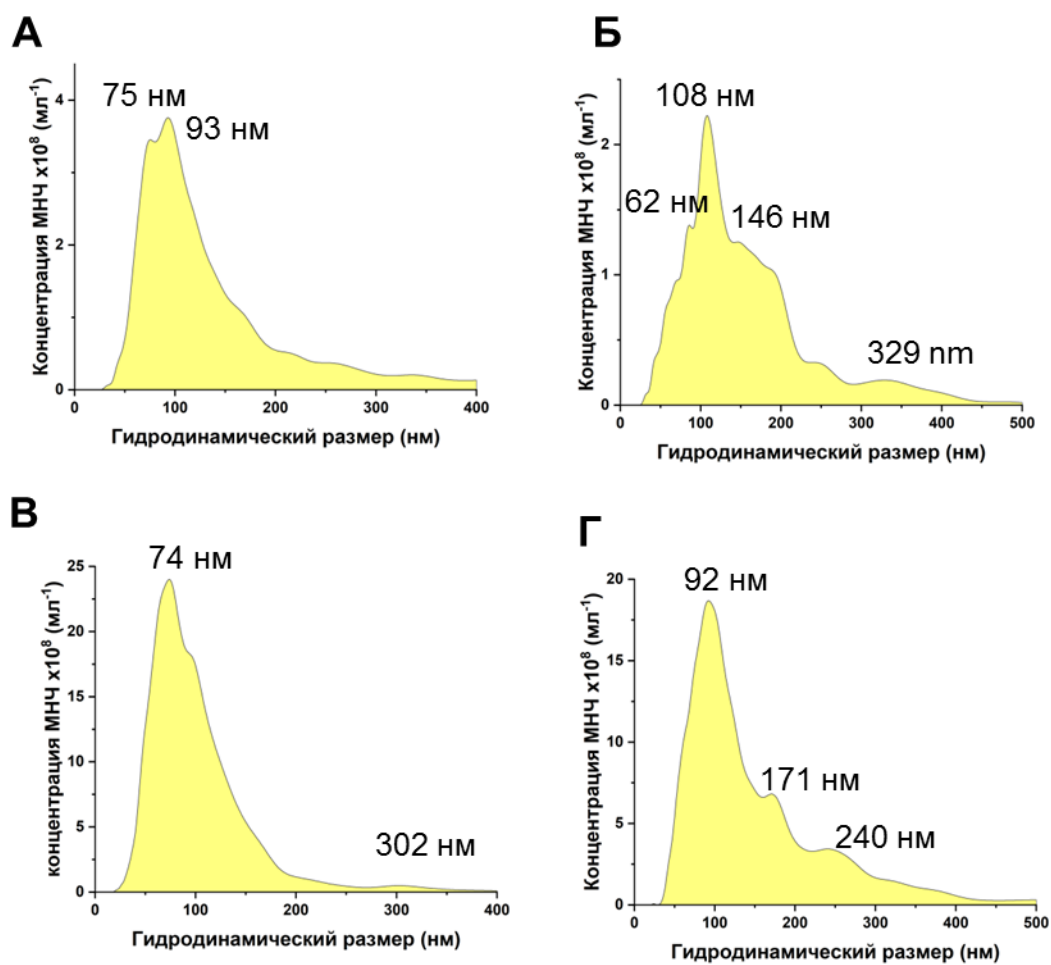


Рисунок S 4. Графики распределения по размерам образцов (А) D1, (Б) D2, (В) D3, (Г) D4, полученные методом NTA.

П.3 ^1H ЯМР спектры дофамина и нитродофамина

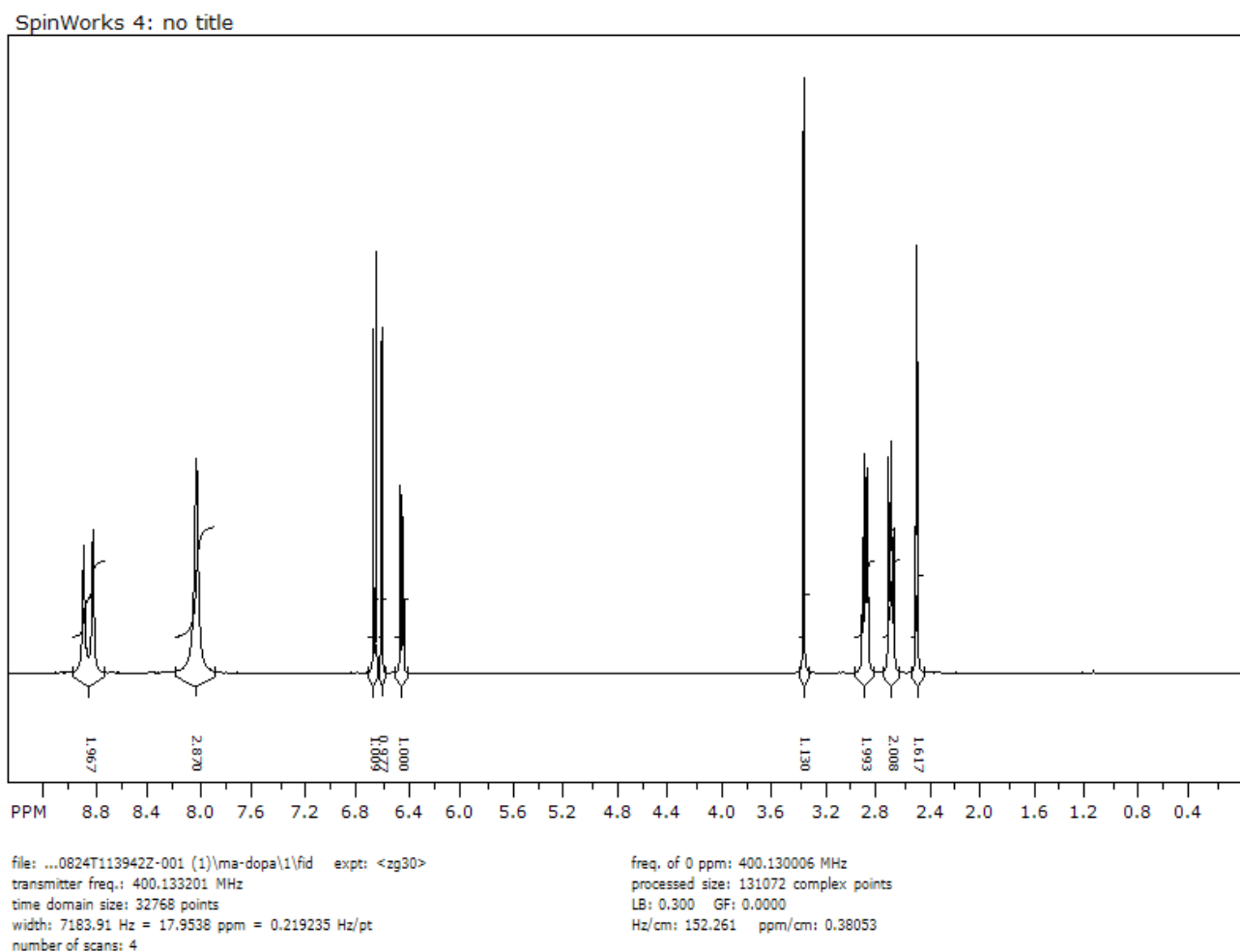


Рисунок S 5. ^1H ЯМР спектр дофамина гидрохлорида в CDCl_3 . 2,49 ppm (M, 1,6H), 2,69 ppm (T, 2H), 2,89 ppm (T, 2H), 3,36 ppm (S, 1H), 6,45-6,47 ppm (DD, 1H), 6,61 ppm (D, 1H), 6,67 ppm (D, 1H), 8,04 ppm (S, 3H), 8,87 ppm (D, 2H).

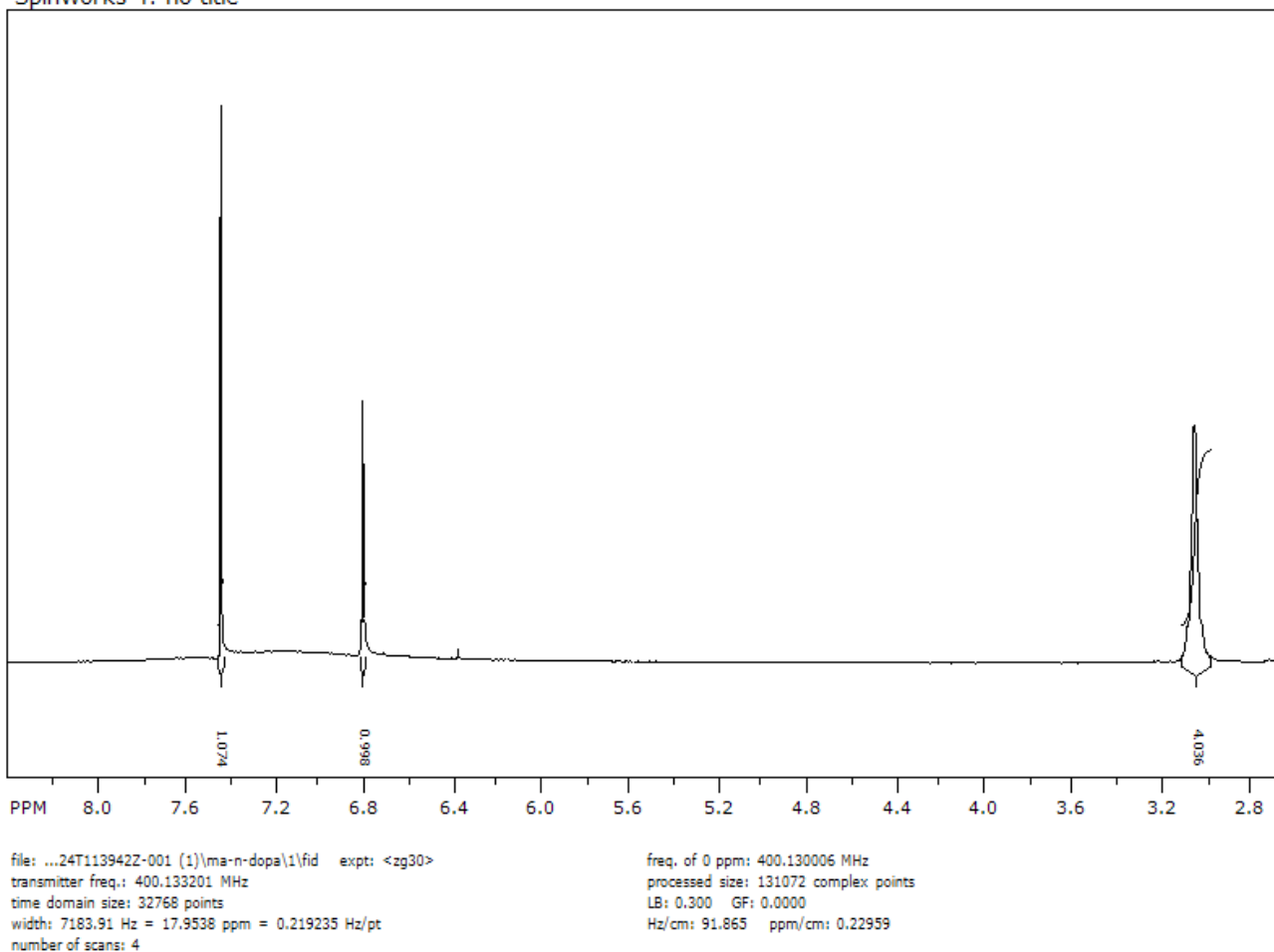


Рисунок S 6. ^1H ЯМР спектр нитродофамин сульфата в CDCl_3 . 3,04 ppm (S, 4H), 6,81 ppm (S, 1H), 7,45 ppm (S, 1H).