

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
химических наук

Москва – 2024

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель – **Клячко Наталья Львовна**
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты – **Виноградов Владимир Валентинович**
доктор химических наук
Национальный исследовательский
университет ИТМО, директор Химико-
Биологического кластера

Мелик-Нубаров Николай Сергеевич
доктор химических наук
Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, ведущий
научный сотрудник

Горин Дмитрий Александрович
доктор химических наук, профессор
Сколковский институт науки и
технологии, центр фотоники и
фотонных технологий, профессор

Защита диссертации состоится « » 20 г. в часов на заседании
диссертационного совета МГУ 014.4 Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 11Б, ауд. 202.
E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ
имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте:
<https://dissovet.msu.ru/dissertation/2744>

Автореферат разослан « » 20 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

И.К. Сакодынская

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. Ферменты - это уникальные белковые «машинь», 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 НЧПМП 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 НЧПМП. Доказана МНМ природа воздействия НЧПМП 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 НЧПМП 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 НЧПМП, 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 НЧПМП на ферментативную активность.

Теоретическая и практическая значимость работы. Показана возможность удаленно регулировать активность ферментов, входящих в состав агрегатов с МНЧ, с помощью НЧПМП. Такие агрегаты являются перспективными материалами для использования при разработке ферментативных каскадов. Описанные тенденции влияния НЧПМП 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 НЧПМП 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 НЧПМП, возможность протекания которого определяется размером и фазовым составом МНЧ.
2. Воздействие НЧПМП приводит к изменениям во вторичной структуре ХТ в составе агрегатов МНЧ-ХТ-МНЧ с модифицированными amino- или карбоксильными группами фермента. Снижение активности фермента под воздействием НЧПМП является следствием ухудшения способности фермента связывать субстрат. Все изменения носят обратимый характер. Влияние НЧПМП на центр связывания субстрата подтверждается результатами компьютерного моделирования поведения ХТ под действием растягивающих сил.
3. Воздействие НЧПМП 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 НЧПМП на активность ферментов.
4. Природа ингибитора оказывает влияние на возможность управления активностью фермента под действием НЧПМП. Для пары ХТ-ингибитор трипсина (ИТ) наблюдается разрушение комплекса и частичное восстановление активности. Для пары ХТ-ингибитор Баумана-Бирк (ИББ) действие НЧПМП 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 РФФ (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.

Основное содержание работы

Синтез МНЧ со способностью к Брауновской релаксации. Успешная реализация МНМ подхода к управлению активностью ферментов подразумевает использование МНЧ, способных ковалентно иммобилизовать белки и претерпевать Брауновский механизм релаксации во внешнем НЧПМП. Иммобилизация белков на поверхности МНЧ достигалась за счет введения золота в состав МНЧ, способного связывать серосодержащие функциональные лиганды. Способность к Брауновской релаксации достигалась благодаря правильно подобранным размерам и фазовому составу магнитной составляющей МНЧ. В этой части работы проводился синтез МНЧ магнетит-золото типа ядро-оболочка и гантель и изучение их свойств на предмет способности претерпевать Брауновский механизм релаксации во внешнем НЧПМП.

Синтез МНЧ магнетит-золото типа ядро оболочка и гантель. На первой стадии синтеза МНЧ магнетит-золото типа ядро-оболочка были получены НЧ магнитных ядер по методу соосаждения солей Fe^{2+} и Fe^3 , обладающие сферической формой (Рисунок 1А) и средний размер 9 ± 2 нм (Рисунок 1Г). Покрытие НЧ магнитных ядер золотой оболочкой осуществляли по методу цитратного восстановления золотохлороводородной кислоты. На микрофотографиях ПЭМ синтезированных МНЧ (Рисунок 1Б) типа ядро-оболочка наблюдались сферические НЧ размером 31 ± 1 нм (Рисунок 1Д).

МНЧ типа гантель были синтезированы по методу термического разложения пентакарбонила железа на поверхности НЧ золота, получаемых *in situ* в процессе синтеза. На микрофотографиях ПЭМ синтезированных ГМНЧ наблюдались попарно соединенные на границе раздела фаз НЧ магнетита и золота, образующие так называемую гантелевидную структуру (Рисунок 1В). НЧ магнетита, входящие в состав ГМНЧ, имели сферическую или слабо ограниченную форму, а их размер составлял 13 ± 1 нм (Рисунок 1Е черные столбики). Размер НЧ золота составлял $3,4\pm 0,1$ нм (Рисунок 1Е красные столбики).

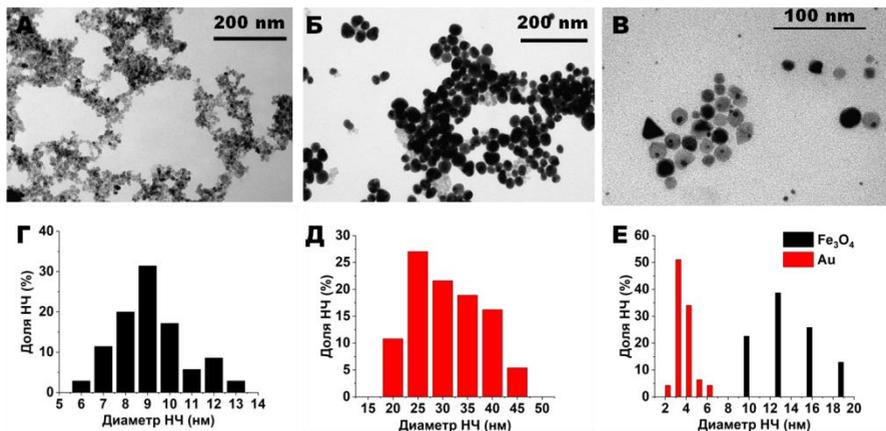


Рисунок 1. Характеризация НЧ магнитных ядер, МНЧ типа ядро-оболочка и МНЧ типа гантель методом ПЭМ. (А-В) ПЭМ микрофотографии (А) НЧ магнитных ядер, (Б) МНЧ типа ядро-оболочка, (В) МНЧ типа гантель. (Г-Е) Гистограммы распределений по размерам соответствующих НЧ.

Изучение фазового состава синтезированных МНЧ методом Мессбауэровской спектроскопии. Фазовый состав синтезированных НЧ магнитных ядер и гантелевидных МНЧ (ГМНЧ) был изучен методом Мессбауэровской спектроскопии. В Таблице 1 представлены обобщенные параметры, полученные на основе анализа Мессбауэровского спектра НЧ магнитных ядер и ГМНЧ. Для НЧ магнитных ядер соотношение $Fe^{2+}/Fe_{общ}$ составило 0,21, что значительно отличается от данного соотношения для стехиометрического магнетита ($Fe^{2+}/Fe_{общ} = 0,33$), что позволяет говорить о том, что фазовый состав синтезированных НЧ магнитных ядер можно определить как смесь магнетит/маггемит в соотношении $\sim 2/1$. Для ГМНЧ соотношение $Fe^{2+}/Fe_{общ}$ составило 0,31, что всего на 0,02 отличается от соотношения для стехиометрического магнетита, и, таким образом, можно сказать, что магнитная часть в ГМНЧ представлена фазой чистого магнетита.

Таблица 1. Обобщенные параметры, полученные в результате обработки Мессбауэровских спектров 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 , %	$Fe^{2+}/Fe_{общ}$
Магнитные ядра	50.88	36.50	0,21
ГМНЧ	39,9	60,1	0,31

Вычисление критического радиуса, определяющего механизм релаксации МНЧ магнетита и маггемита. Нами было уточнено значение критического радиуса R_c МНЧ (радиуса МНЧ, при котором происходит переход между Неелевским и Брауновским механизмами релаксации) для магнетита и рассчитано для маггемита в водном растворе при комнатной температуре. Так, значение R_c составило $\sim 4,1$ и $\sim 5,9$ нм для магнетита и

магнетита, соответственно (Рисунок 2). 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 претерпевают Брауновский механизм релаксации, поскольку средний размер их магнитной части на $\sim 2,5$ нм больше, чем рассчитанное нами значение R_c для чистого магнетита.

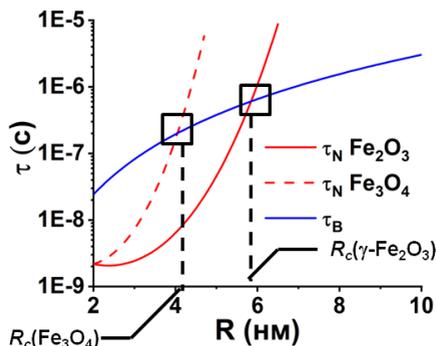


Рисунок 2. Зависимость характерных времен Неелевского (τ_N) и Брауновского (τ_B) механизмов релаксации для магнетита Fe_3O_4 и маггемита $\gamma-Fe_2O_3$. Черный пунктир показывает критический радиус R_c , при котором происходит переход между двумя механизмами.

Регуляция активности ферментов, иммобилизованных на МНЧ магнетит-золото, в результате изменения их структуры под воздействием НЧПМП. МНМ подход к регулированию активности ферментов подразумевает, что в результате вращательно-колебательных движений МНЧ в НЧПМП генерируются силы и деформации, приложенные 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. 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. 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).

Изучение механизма инактивации ХТ в агрегате типа МНЧ-ХТ-МНЧ («димер») под воздействием НЧПМП. МНЧ магнетит-золото типа ядро-оболочка были функционализированы двумя типами серосодержащих лигандов: липоевой кислотой (образец МНЧ-ЛК) или цистамином (образец МНЧ-ЦА). Поверхность функционализированных МНЧ была заряжена отрицательно: по данным DLS ζ -потенциал составил (-30 ± 7) и (-15 ± 1) мВ для МНЧ-ЛК и МНЧ-ЦА, соответственно. В зависимости от типа используемых функционализированных МНЧ в результате иммобилизации ХТ были получены образцы МНЧ-ЛК-ХТ и МНЧ-ЦА-ХТ, в которых были модифицированы амино- или карбоксильные группы фермента, соответственно.

По данным NTA в результате связывания ХТ с поверхностью обоих типов функционализированных МНЧ наблюдалось увеличение гидродинамических размеров в $\sim 2,5-3,2$ раза (Таблица 2). 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 было подтверждено с помощью анализа микрофотографий ПЭМ (Рисунок 3), на которых наблюдалось увеличение доли агрегатов НЧ после связывания белка.

Таблица 2. Средний гидродинамический размер функционализированных МНЧ до и после связывания с ХТ, вычисленный в результате анализа образцов методом NTA.

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

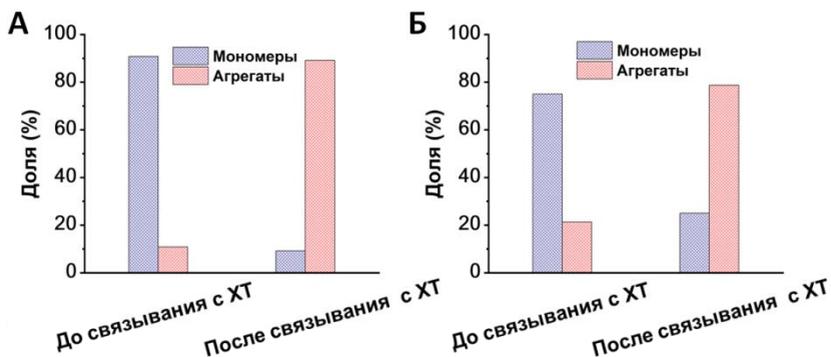


Рисунок 3. Анализ микрофотографий ПЭМ до и после связывания ХТ с МНЧ. Изменение доли мономеров и агрегатов МНЧ до и после связывания с ХТ на поверхности (А) МНЧ-ЛК и (Б) МНЧ-ЦА.

Для изучения изменений во вторичной структуре ХТ под действием НЧПМП использовали метод ИК-Фурье спектроскопии в режиме нарушенного полного внутреннего отражения. В Таблице 3 представлено содержание элементов вторичной структуры (α -спирали, β - и неупорядоченные структуры) для нативного и ХТ в составе образцов МНЧ-ЛК-ХТ и МНЧ-

ЦА-ХТ до, сразу после и через 3 часа после воздействия «пульсирующего» НЧПМП ($f = 50$ Гц, $B = 140$ мТл, Пульс/Пауза = 1 мин/30 с), определенное с помощью деконволюции спектральной области Амид I. Содержание элементов вторичной структуры нативного и конъюгированного ХТ хорошо согласовывалось с данными литературы (11% α -спиралей, 55% β -структур, 34% неупорядоченных структур). Воздействие НЧПМП на нативный ХТ не приводило к существенным изменениям в содержании элементов вторичной структуры, 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 разных агрегатов ХТ с МНЧ вели себя по-разному. Так, доля β -структур в МНЧ-ЦА-ХТ 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. Изменения носили обратимый характер, и через 3 часа после воздействия НЧПМП доля β - и неупорядоченных структур полностью или частично восстанавливалась до исходных значений.

Таблица 3. 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

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, что может свидетельствовать о механической природе воздействия НЧПМП на фермент. Изменения были полностью или частично обратимы, что согласуется с данными литературы.

Влияние «пульсирующего» НЧПМП на кинетические параметры ХТ изучалось спектрофотометрически по реакции гидролиза субстрата NSAAPpNA. Ферментативную реакцию регистрировали после воздействия НЧПМП на ХТ. Из Рисунка 4А видно, что в результате воздействия НЧПМП на ХТ в агрегате типа МНЧ-ХТ-МНЧ наблюдалось уменьшение значений начальной скорости реакции V . Эффект снижения активности под воздействием НЧПМП был обратимым, и спустя 3 часа после воздействия активность ХТ практически полностью восстанавливалась (Рисунок 4Б), что согласуется с данными об изменениях во вторичной структуре фермента, полученными ранее.

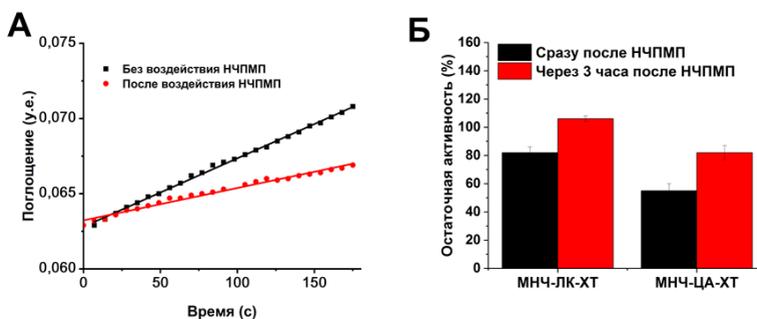


Рисунок 4. Влияние трех циклов «пульсирующего» НЧПМП ($f = 50$ Гц, $B = 140$ мТл, Пульс/Пауза = 1 мин/30 с) на ферментативную активность ХТ в составе МНЧ-ЛК-ХТ и МНЧ-ЦА-ХТ. (А) Кинетические кривые реакции гидролиза субстрата NSAAPpNA (7,5 мкМ) под действием МНЧ-ЦА-ХТ. (Б) Восстановление остаточной активности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

Было проведено изучение зависимости скорости реакции, катализируемой ферментом в составе агрегатов, от концентрации субстрата, и были рассчитаны кинетические параметры (K_M и V_M) для нативного ХТ и ХТ в агрегатах МНЧ-ЛК-ХТ и МНЧ-ЦА-ХТ, которые представлены в Таблице 4. Видно, что действие НЧПМП не приводит к изменению кинетических параметров нативного ХТ. Также воздействие НЧПМП не приводит к изменению V_M для ХТ в агрегатах. В то же время наблюдается увеличение значений K_M в $\sim 2,5$ раза для ХТ в составе МНЧ-ЦА-ХТ, (для ХТ в составе МНЧ-ЛК-ХТ изменения были менее выраженными). Таким образом, было показано, что в результате воздействия НЧПМП для ХТ в агрегатах двух типов наблюдается снижение каталитической активности, обусловленное увеличением значений константы Михаэлиса, то есть ухудшение связывания субстрата в активном центре фермента. Отсутствие изменений в значениях V_M говорит о том, что воздействие НЧПМП, скорее всего, не затрагивало каталитический участок активного центра фермента.

Таблица 4. Влияние трех циклов «пульсирующего» НЧПМП ($f = 50$ 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.

Название образца	K_M , мкМ		V_M , мкМ/мин	
	До воздействия НЧПМП	После воздействия НЧПМП	До воздействия НЧПМП	После воздействия НЧПМП
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	$0,8 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$

Данные Таблицы 3 и Таблицы 4 хорошо согласуются между собой и свидетельствуют о том, что, по-видимому, снижение активности 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 НЧПМП. Еще раз подчеркнем, что изменения как вторичной структуры, так и активности носили обратимый характер и были более значимы для фермента с модифицированными карбоксильными группами. Полученные данные хорошо согласуются с данными литературы и могут быть объяснены изменением подвижности области связывания субстрата.

Для подтверждения влияния НЧПМП на эффективность связывания субстрата в активном центре ХТ, проведено компьютерное моделирование поведения ХТ под действием растягивающих сил¹ с использованием трех протоколов: «амино-растягиваемый» и «карбоксильно-растягиваемый», в которых радиально направленные силы величиной 80 пН были приложены к остаткам Lys-79, 90, 107, 175, 202 или Glu-21, 49, Asp-64, 129, соответственно, и направлены радиально от центра молекулы ХТ, а также «нерастягиваемый», в котором к поверхностным остаткам молекулы ХТ не прикладывали силовое воздействие. Величины растягивающих сил в молекулярном моделировании совпадали с теоретически рассчитанными значениями, создаваемыми МНЧ в НЧПМП. 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. Анализ траектории свидетельствовал, что белковая глобула достаточно жесткая. Отдельно было проанализировано влияние растягивающих сил на структуру каталитической триады и центра связывания субстрата. На Рисунке 5А, Б показаны функции распределения расстояний между парами атомов His-57:N_{δ1} Asp-102:O_{δ2} и His-57:N_{δ2} Ser-195:O_γ в ходе моделирования, из которых видно, что силовое воздействие не приводило к изменениям, которые были бы существенны для эффективного функционирования каталитической триады. В то же время под действием сил расстояния между парами атомов Cys-191:C_α и Ser-217:C_α, и Cys-191:C_α и Ser-218:C_α, образующими вход в сайт связывания субстрата,

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

быстро (в течение 0,2-0,3 нс) сокращались с $\sim 8,2 \text{ \AA}$ до $\sim 5 \text{ \AA}$ для пары Cys-191:С $_{\alpha}$ и Ser-217:С $_{\alpha}$ (Рисунок 5В) и с $\sim 8,6 \text{ \AA}$ до $\sim 6 \text{ \AA}$ для пары Cys-191:С $_{\alpha}$ и Ser-218:С $_{\alpha}$ (Рисунок 5Г). Отметим, что изменения наблюдались только для протоколов, в которых были приложены силы. 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. Таким образом, результаты компьютерного моделирования подтверждают данные кинетического эксперимента о влиянии НЧМПП на K_M , а не на V_M для фермента в агрегатах типа МНЧ-ХТ-МНЧ.

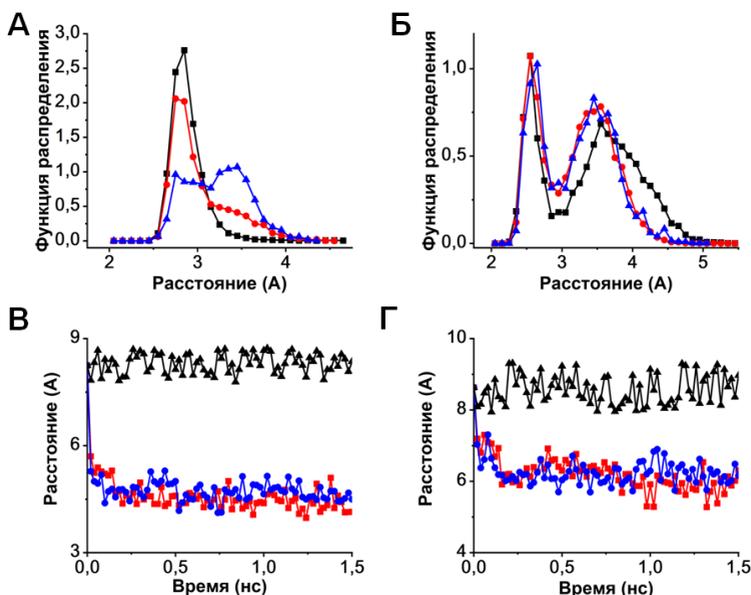


Рисунок 5. Компьютерное моделирование изменений в каталитической триаде и центре связывания субстрата ХТ под действием растягивающих сил. (А, Б) Функция распределения расстояний между парами атомов каталитической триады: (А) His-57:N $_{\delta 1}$ Asp-102:O $_{\delta 2}$ (Б) His-57:N $_{\delta 2}$ Ser-195:O $_{\gamma}$. (В, Г) Эволюция расстояний между парами С $_{\alpha}$ атомов аминокислотных остатков, формирующих вход в сайт связывания субстрата: (В) Cys-191:С $_{\alpha}$ и Ser-217:С $_{\alpha}$ (Г) Cys-191:С $_{\alpha}$ Ser-218:С $_{\alpha}$. Внешние силы величиной 80 пН, радиально направленные от центра молекулы, были приложены к (1) N $_{\epsilon}$ атомам Lys-79, 90, 107, 175 и 202 (показаны красным), (2) С $_{\beta}$ атомам остатков Glu-21 и 49 и С $_{\delta}$ атомам остатков Asp-64 и 129 (показаны синим) или (3) не были приложены (показаны черным). Исходная рентгеновская структура молекулы ХТ получена из базы данных Protein Data Base (код PDB 1ACB).

Инактивация АДГ в агрегатах типа МНЧ-фермент-МНЧ («димер») под воздействием НЧМПП. АДГ, фермент из класса оксидоредуктаз, который широко используется при разработке процессов синтеза различных соединений. 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 НЧПМП.

АДГ была иммобилизована на поверхности МНЧ магнетит-золото типа ядро-оболочка, функционализированных липоевой кислотой. Для инактивации фермента под воздействием НЧПМП необходимым условием является наличие агрегатов, в которых фермент связан одновременно с несколькими МНЧ. Поэтому для получения наибольшего количества таких агрегатов, а, следовательно, и наибольшего влияния НЧПМП на активность фермента варьировали условия связывания с фермента с МНЧ (Таблица 5), 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 5. Соотношения АДГ:МНЧ и EDC/S-NHS:АДГ, (соотношение EDC:S-NHS 1:1), использованные при связывания 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 6. Так, в результате связывания гидродинамический размер всех агрегатов АДГ с МНЧ увеличился в ~2-3 раза по сравнению с немодифицированными МНЧ. Для всех агрегатов наблюдался сдвиг положения моды на распределение НЧ по размерам в сторону больших значений, а также появление дополнительных мод на распределении НЧ по размерам (Таблица 6), что может свидетельствовать об образовании агрегатов, в состав которых входит несколько МНЧ. Для всех образцов варьирование концентрации белка и сшивающих агентов в широких диапазонах не приводило к изменению гидродинамических параметров получаемых агрегатов. Отметим, что концентрация агрегатов в образцах с низкой концентрацией белка была значительно ниже, чем в агрегатах с высокой концентрацией белка (Таблица 6). Таким образом, в результате связывания АДГ с МНЧ были получены образцы, гидродинамические характеристики которых говорят об образовании агрегатов, состоящих из нескольких МНЧ. За активностью АДГ в агрегатах типа МНЧ-фермент-МНЧ следили спектрофотометрически, регистрируя изменения концентрации НАДН в реакции окисления этанола. Было обнаружено, что варьирование соотношения реагентов в ходе иммобилизации АДГ приводит к существенным изменениям значений величин V реакции окисления этанола (Рисунок 6А). Так, увеличение количества фермента при иммобилизации в 3 раза приводило к увеличению значений V в ~2-4 раза (Рисунок 6А, 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 (Рисунок 6А, сравнить активности образцов D1 и D2 между собой и образцов D3 и D4 между собой). Следует отметить, что концентрация НЧ была одинаковой для всех экспериментов и составляла 1×10^{10} НЧ/мл. Наблюдаемое увеличение активности АДГ при увеличении

концентрации фермента говорит о том, что, по-видимому, происходит как ковалентное, так и нековалентное связывание фермента на поверхности МНЧ. 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.

Таблица 6. Средний гидродинамический размер, положение максимумов на распределении 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

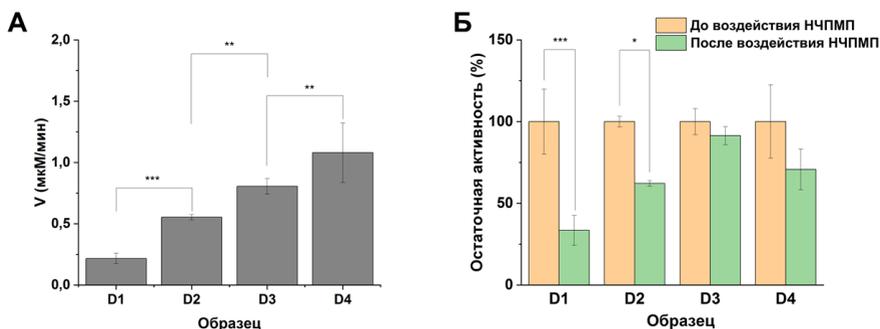


Рисунок 6. Влияние трех циклов «пульсирующего» НЧПМП ($f = 50$ Гц, $B = 140$ мТл, Пульс/Пауза = 1 мин/30 с) на ферментативную активность АДГ в составе агрегатов МНЧ-АДГ-МНЧ. (А) Начальные скорости реакции (V) для образцов, полученных при разных соотношениях белка и сшивающих агентов (D1-D4). (Б) Изменение 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 6Б 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 окисления этанола, катализируемой АДГ в составе агрегатов, причем глубина этих изменений была различна для разных образцов с различным содержанием белка и степени сшивки (Рисунок 6Б). Так, в результате

воздействия НЧПМП значение остаточной активности составило $(33 \pm 9)\%$ и $(62 \pm 2)\%$ для образцов D1 и D2, соответственно. В то же время для образцов D3 и D4 наблюдаемые изменения активности были менее выраженными (незначительными статистически). Отметим, что для образца D1, который был синтезирован при низкой концентрации фермента и высокой концентрации сшивающих агентов, наблюдается наибольший эффект снижения активности в результате воздействия НЧПМП. 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 существенного воздействия НЧПМП на фермент в составе «димерного» агрегата, в образце D2 было меньше, чем в образце D1. Увеличение концентрации фермента в реакции связывания с МНЧ не показывает существенного (статистически значимого) воздействия НЧПМП 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 НЧПМП было аналогично инактивации ХТ в агрегатах типа МНЧ-ХТ-МНЧ, 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 НЧПМП. На Рисунке 7 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 НЧПМП (Рисунок 7 Б) молекулы E_1 , доля которых не может превышать 10% от общего количества фермента на поверхности МНЧ, испытывают деформации растяжения, сдавливания, скручивания и сдвига. При этом часть молекул E_2 («субпопуляция» E_{2a}) может испытывать деформации сдавливания, скручивания и сдвига, а другая часть («субпопуляция» E_{2b}) не будет подвержена воздействию сил со стороны МНЧ. Таким образом, максимальная доля молекул фермента, которая может быть подвержена деформации со стороны МНЧ, составляет примерно 50-60%.

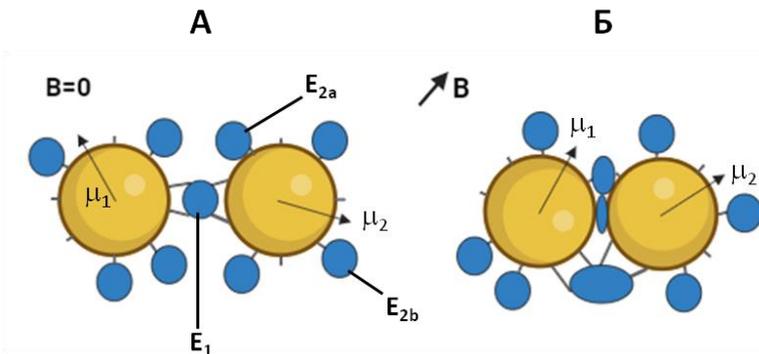


Рисунок 7. Схема МНМ подхода к управлению ферментативными реакциями. (А) Агрегат, состоящий из двух МНЧ с магнитными моментами μ_1 и μ_2 и молекул фермента (E_1 , E_{2a} и E_{2b}) на поверхности МНЧ. (Б) Вращательно-колебательные движения МНЧ, которые стремятся сориентировать свои магнитные моменты вдоль линий внешнего магнитного поля B , создают деформации растягивания, сжатия, скручивания и сдвига, приложенные к молекулам фермента (E_1 и E_{2a}) на поверхности МНЧ.

На основании экспериментальных данных сформулированы основные закономерности для выбора условий связывания фермента с поверхностью МНЧ, которые определяют эффективность воздействия НЧПМП (увеличение количества агрегатов типа МНЧ-фермент-МНЧ и уменьшение количества агрегатов типа МНЧ-фермент):

- изменение количества фермента (при неизменном количестве МНЧ) важно для регуляции активности фермента в составе агрегата (стремление к уменьшению количества фермента при неизменном количестве МНЧ)
- изменение количества сшивающих агентов (при неизменном количестве фермента) важно для регуляции активности фермента (стремление к увеличению количества сшивающих агентов при неизменном количестве белка)

Управление взаимодействием фермент-ингибитор в агрегатах МНЧ-фермент и МНЧ-ингибитор с помощью НЧПМП. В результатах, обсужденных выше, было подробно описано 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» МНЧ типа МНЧ-фермент и МНЧ-ингибитор, при смешивании которых происходит образование «димерного» агрегата за счет комплекса фермент-ингибитор. Используя ингибиторы с различными константами, можно «прощупать» прочность комплекса 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 ($K_i(\text{ИТ})= 1, \times 10^{-6}$ М, $K_i(\text{ИББ})= 6,4 \times 10^{-9}$ М).

ХТ и ИТ были иммобилизованы на поверхности МНЧ типа ядро-оболочка, функционализированных липоевой кислотой. Синтезированные агрегаты, а также комплекс, образующийся при их смешивании, были охарактеризованы методами НТА (Таблица 7) и ПЭМ (Рисунок 8). Из Таблицы 7 видно, что 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, что говорит об образовании «мономерных» агрегатов. При этом средний размер и положение моды распределения для комплекса МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ, полученного смешиванием двух агрегатов, значительно возрастают. Из Рисунка 8 видно, что МНЧ-ХТ и МНЧ-ИТ представляют собой «мономерные» агрегаты (Рисунок 8 А, Б), а комплекс МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ – крупный ассоциат НЧ (Рисунок 8 В).

Таблица 7. Средний гидродинамический размер и положение моды распределения НЧ по размерам для МНЧ, модифицированных липоевой кислотой, агрегатов МНЧ-ХТ и МНЧ-ИТ, а также их комплекса МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ (соотношение 1:20), полученные методом НТА. Данные среднего размера представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

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

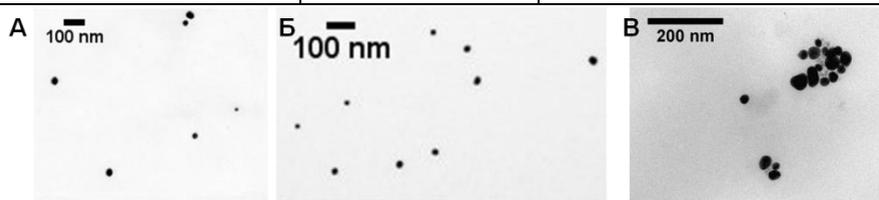


Рисунок 8. Микрофотографии ПЭМ агрегатов (А) МНЧ-ХТ, (Б) МНЧ-ИТ, а также (В) их комплекса МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ (соотношение 1:20).

Для изучения влияния НЧПМП на активность фермента в составе агрегата МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ были подобраны условия проведения кинетического эксперимента (соотношение фермент/ингибитор $S_E/S_I = 1/20$ и время предварительного инкубирования 90 с), при которых остаточная активность ХТ составила 30%.

Для изучения влияния НЧПМП на активность фермента в составе агрегата МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ использовали функцию генерирования НЧПМП *in situ*, регистрируя кинетические кривые продукт-время непосредственно под действием магнитного поля. На Рисунке 9 показаны кинетическая кривая и остаточная активность фермента в агрегате МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ в отсутствие и присутствии НЧПМП. Как видно из Рисунка 9 А, включение НЧПМП вызывало увеличение активности фермента, в 1,5 раза. На Рисунке 9 Б приведены данные остаточной активности фермента после статистической обработки серии из трех

кинетических кривых в виде процента к исходной активности ХТ в агрегате МНЧ-ХТ в отсутствие МНЧ-ИТ.

Предполагаемый механизм восстановления активности фермента в агрегате МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ под действием НЧППП заключается в следующем (Рисунок 10):

- При смешивании двух агрегатов, МНЧ-ХТ и МНЧ-ИТ, происходит образование «димерного» агрегата МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ. При этом активный центр блокируется, и активность фермента снижается (Рисунок 10 А, Рисунок 9 Б, зеленый столбик).
- Силы, возникающие при вращательно-колебательных движениях МНЧ в НЧППП, 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 10 Б, Рисунок 9Б красный столбик).

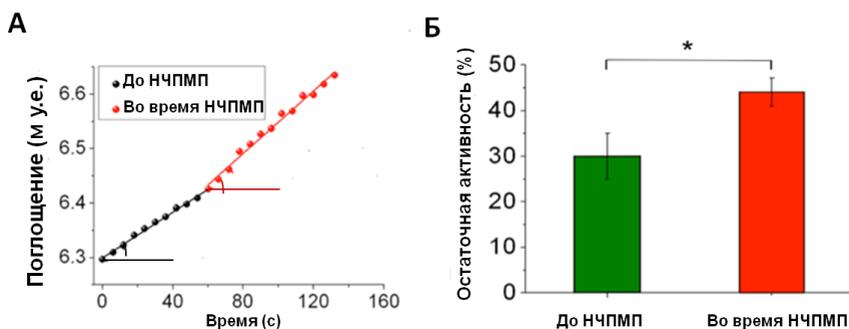


Рисунок 9. Влияние НЧППП ($f = 60$ Гц, $B = 88$ мТл) на активность фермента в агрегате МНЧ-ХТ-ИТ-МНЧ. (А) Кинетическая кривая продукт-время. (Б) Остаточная активность фермента в серии из трех кинетических кривых. За 100% взята активность ХТ в агрегате МНЧ-ХТ. Соотношение $C_E/C_I = 1/20$, 20 мМ ТРИС-буфер (рН 8,2), 7,5 мкМ NSAAPFpNA, 25°C; $n=3$ * $p \leq 0,05$.

В ряде контрольных экспериментов мы убедились в том, что НЧППП не оказывает влияния ни на свободный комплекс ХТ-ИТ, ни на агрегат МНЧ-ХТ, ни на комплекс (МНЧ-ХТ + ИТ) или (МНЧ-ИТ + ХТ).

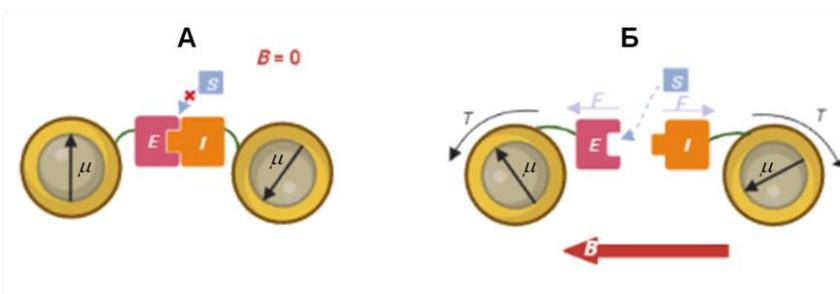


Рисунок 10. Схема восстановления активности фермента (E) в агрегате со строением МНЧ-фермент-ингибитор-МНЧ под действие НЧПМП. (А) Образование «димерного» агрегата при взаимодействии E и I , приводит к блокированию активного центра фермента для доступа субстрата S . (Б) Действие НЧПМП напряженности B , 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 .

Для того чтобы «прощупать» прочность комплекса фермент-ингибитор и возможность его разрушения под действием НЧПМП, мы использовали ИББ с более сильным взаимодействием с ферментом ($K_i(\text{ИТ})/K_i(\text{ИББ}) \approx 10^3$). В данном случае нами наблюдался принципиально иной эффект действия НЧПМП. Нами не обнаруживалось восстановления активности фермента (как на Рисунке 9 А), поскольку сил, создаваемых вращательно-колебательными движениями МНЧ в НЧПМП, было недостаточно для разрыва комплекса с более низкой константой ингибирования (Рисунок 11 А). Более того, при высоких значениях индукции B НЧПМП

наблюдалась полная потеря активности фермента за счет возможной агрегации МНЧ (Рисунок 11 Б, В). Важно отметить, что для всех значений B НЧПМП изменения были обратимыми: активность фермента восстанавливалась при отключении НЧПМП (на Рисунке 11 синие точки). Также следует отметить, что в контрольном эксперименте было показано, что НЧПМП не влияет на активность ХТ в агрегате ГМНЧ-ХТ. На Рисунке 11 Г показана статистическая обработка серии кривых, демонстрирующих описанные изменения.

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. Так, сил, создаваемых вращательно-колебательными движениями МНЧ в НЧПМП, в случае ИТ оказывается 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. Более того, используя ингибитор с более сильной константой ингибирования, нам удалось не только добиться отсутствия разрушения комплекса между ферментом и ингибитором, но и полностью инактивировать ХТ за счет образования более крупных агрегатов ГМНЧ и блокирования активного центра для

субстрата при воздействии НЧПМП. Схема такой инактивации представлена на Рисунке 12 А, Б.

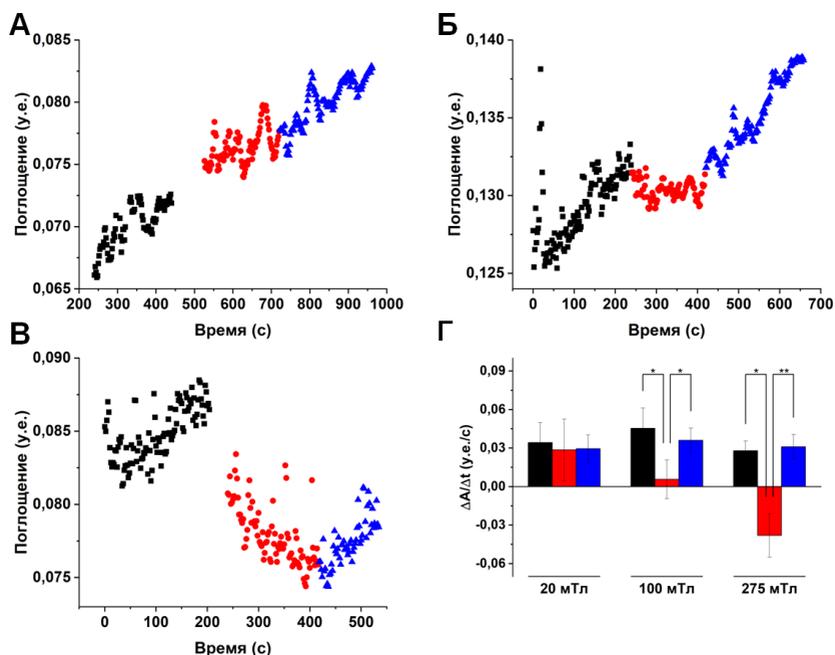


Рисунок 11. Влияние включения и выключения НЧПМП ($f = 50$ Гц) на активность фермента в агрегате ГМНЧ-ХТ-ИББ-ГМНЧ. (А-В) Влияние НЧПМП напряженностью (А) 20 мТл, (Б) 100 мТл и (В) 275 мТл на ход кинетических кривых продукт-время (выраженных в единицах поглощения). (Г) Значения скорости реакции ($\Delta A/\Delta t$) 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. Для получения агрегата ГМНЧ-ХТ-ИББ-ГМНЧ использовали соотношение ГМНЧ-ХТ/ГМНЧ-ИББ = 1/6. Концентрация ГМНЧ-ХТ $7,4 \times 10^8$ НЧ/мл. 20 мМ ТРИС-буфер (рН 8,2), 40 мкМ NSAAPFPNA, 25°C. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ($n = 3$).

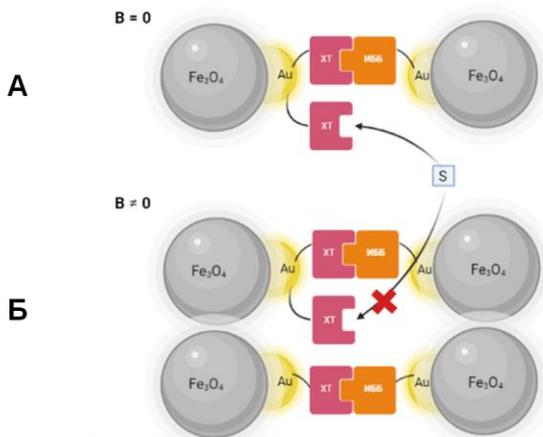


Рисунок 12. Схема поведения фермента в агрегате ГМНЧ-ХТ-ИББ-ГМНЧ в отсутствие и присутствии НЧПМП. (А) В отсутствие внешнего магнитного поля ($B = 0$) часть молекул ХТ не связана с ингибитором, активный центр доступен для субстрата. (Б) При воздействии НЧПМП ($B \neq 0$) не происходит разрыва комплекса ХТ-ИББ и происходит образование крупных агрегатов ГМНЧ, в результате которого 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 НМ 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 которых 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 ассоциатов, в которых активный центр фермента экранирован от взаимодействия с субстратом, в результате чего наблюдается 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.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus

1. Majouga A. et al. Enzyme-functionalized gold-coated magnetite nanoparticles as novel hybrid nanomaterials: synthesis purification and control of enzyme function by low-frequency magnetic field / Majouga A., Sokolsky-Papkov M., Kuznetsov A., Lebedev D., Efremova M., Beloglazkina E., Rudakovskaya P., **Veselov M.**, Zyk N., Golovin Yu, Klyachko N., Kabanov A. // Colloids and

- Surfaces B: Biointerfaces. – 2014. – Vol. 125. – P. 104–109. (объем 0,3 п.л., авторский вклад 40%) [Импакт-фактор Wos JIF=5,999] doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.11.012.
2. Головин Ю.И. и др. Новые подходы к нанотераностике: полифункциональные магнитные наночастицы, активируемые негреющим низкочастотным магнитным полем, управляют биохимической системой с молекулярной локальностью и селективностью / Головин Ю.И., Клячко Н.Л., Мажуга А.Г., Грибановский С.Л., Головин Д.Ю., Жигачев А.О., Шуклинов А.В., Ефремова М.В., **Веселов М.М.**, Власова К.Ю., Усвалиев А.Д., Ле-Дейген И.М., Кабанов А.В. // Российские нанотехнологии. – 2018. – Т. 13. – № 5-6. – С. 3-25. (объем 1,4 п.л.) (Golovin Y.I. et al. New Approaches to Nanotheranostics: Polyfunctional Magnetic Nanoparticles Activated by Non-Heating Low-Frequency Magnetic Field Control Biochemical System with Molecular Locality and Selectivity / Golovin Y.I., Klyachko N.L., Majouga A.G., Gribanovsky S.L., Golovin D.Y., Zhigachev A.O., Shuklinov A.V., Efremova M.V., **Veselov M.M.**, Vlasova K.Yu., Usvaliev A.D., Le-Deygen I.M., Kabanov A.V. // Nanotechnologies in Russia. – 2018. – Vol. 13. – № 5–6. – P. 215–239. (объем 1,5 п.л., авторский вклад 40%) [Импакт-фактор Wos JIF=0,173]) doi: 10.1134/S1995078018030060.
3. Efremova M.V. et al. In situ observation of chymotrypsin catalytic activity change actuated by nonheating low-frequency magnetic field / 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. // ACS Nano. – 2018. – Vol. 12. – № 4. – P. 3190–3199. (объем 0,6 п.л., авторский вклад 50%) [Импакт-фактор Wos JIF=18,027] doi: 10.1021/acsnano.7b06439.
4. Власова К.Ю. и др. Магнитные липосомы для контролируемого высвобождения высокомолекулярных молекул в условиях негреющего низкочастотного магнитного поля / Власова К.Ю., Ванзаракшаева С.Ч., Ле-Дейген И.М., **Веселов М.М.**, Петрунин А.В., Прусов А.Н., Шуклинов А.В., Головин Ю.И., Кабанов А.В., Клячко Н.Л. // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2020. – Т.61. – №4. – С. 34-40. (объем 0,4 п.л.) (Vlasova K.Y. et al. Magnetic liposomes for remote controlled high-molecular drugs release under a low-frequency non-heating magnetic field / Vlasova K.Y., Vanzarakshaeva S.C., **Veselov M.M.**, Le-Deygen I.M., Petrunin A.V., Prusov A.N., Shuklinov A.B., Golovin Yu I., Kabanov A.V., Klyachko N.L. // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2020. – Vol. 75 – № 4. – P. 232–237. (объем 0,3 п.л., авторский вклад 50%) [Импакт-фактор Wos JIF=0,7]) doi: 10.3103/S0027131420040112.
5. Бурмистров И.А. и др. Влияние низкочастотного магнитного поля на полиэлектролитные микрокапсулы с наночастицами магнетита / Бурмистров И.А., Трушина Д.Б., Бородина Т.Н., **Веселов М.М.**, Клячко Н.Л., Зайцев В.Б., Gonzalez-Alfaro Y., Букреева Т.В. // Журнал технической физики. – 2020. – №9. – С. 1428-1434. (объем 0,4 п.л.) (Burmistrov I.A. et al. The influence of a low-frequency magnetic field on polyelectrolyte capsules with magnetite nanoparticles / Burmistrov I.A., Trushina D.B., Borodina T.N., **Veselov M. M.**, Klyachko N.L., Zaitsev V. B., González-Alfaro Y., Bukreeva T.V. // Technical Physics. – 2020. – Vol. 65. – P. 1370–1376. (объем 0,3 п.л., авторский вклад 40%) [Импакт-фактор Wos JIF=0,489]) doi: 10.1134/S1063784220090108.

6. **Веселов М.М.** и др. Управление биокатализом пары α -химотрипсин - ингибитор баумана-бирка, иммобилизованных на гибридных наночастицах магнетит-золото, с помощью негреющего низкочастотного магнитного поля / **Веселов М.М.**, Коломоец Н.И., Блинова А.Р., Ефремова М.В., Чудосай Ю.В., Прусов А.Н., Жигачев А.О., Головин Ю.И., Клячко Н.Л. // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2020. – Т. 61. – № 4, С. 287–295. (объем 0,5 п.л.) (Vesellov M.M. et al. Regulation of Biocatalysis with the α -Chymotrypsin–Bowman–Birk Inhibitor Pair Immobilized on Magnetite–Gold Hybrid Nanoparticles Using a Non-Heating Low-Frequency Magnetic Field / **Vesellov M.M.**, Kolomoiec N.I., Blinova A.R., Efremova M.V., Chudosay Yu V., Prusov A.N., Zhigachev A.O., Golovin Yu I., Klyachko N.L. // Moscow University Chemistry Bulletin. – Vol. 75. – № 4. – P. 225-231. (объем 0,4 п.л., авторский вклад 90%) [Импакт-фактор Wos JIF=0,7]) doi: 10.3103/S0027131420040100.
7. Golovin, Y.I. et al. Non-heating alternating magnetic field nanomechanical stimulation of biomolecule structures via magnetic nanoparticles as the basis for future low-toxic biomedical applications / Golovin, Y.I., Golovin, D.Y.; Vlasova, K.Y.; **Vesellov, M.M.**; Usvaliev, A.D.; Kabanov, A.V.; Klyachko, N.L. // Nanomaterials. – 2021. – Vol. 11. – № 9. – P. 2255. (объем 1,4 п.л., авторский вклад 40%) [Импакт-фактор Wos JIF=5,719] doi: 10.3390/nano11092255.
8. Михеев А.В. и др. Высвобождение тритц-декстрана из композитных микрокапсул под воздействием низкочастотного переменного магнитного поля / Михеев А.В., Бурмистров И.А., Зайцев В.Б., Артемов В.В., Хмеленин Д.Н., Старчиков С.С., **Веселов М.М.**, Клячко Н.Л., Букреева Т.В., Трушина Д.Б. // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. – 2022. – № 1. – С. 10-17 (объем 0,4 п.л.) (Mikheev A.V. et al. Release of tritic-dextran from composite microcapsules under the influence of a low-frequency alternating magnetic field / Mikheev A.V., Burmistrov I.A., Zaitsev V.B., Artemov V.V., Khmelenin D.N., Starchikov S.S., **Vesellov M.M.**, Klyachko N.L., Bukreeva T.V., Trushina D.B. // Journal of Surface Investigation: X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques. – 2022. – Vol. 16. – № 1. – P. 7–12. (объем 0,4 п.л., авторский вклад 40%) [Импакт-фактор Wos JIF=0,206] doi: 10.1134/S1027451021060355.
9. Burmistrov I.A. et al. Permeability of the composite magnetic microcapsules triggered by a non-heating low-frequency magnetic field / Burmistrov I.A., **Vesellov 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. // Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 14. – № 1. – P. 65. (объем 1,1 п.л., авторский вклад 50%) [Импакт-фактор Wos JIF=6,525] doi: 10.3390/pharmaceutics14010065.
10. **Vesellov M.M.** et al. Modulation of α -Chymotrypsin Conjugated to Magnetic Nanoparticles by the Non-Heating Low-Frequency Magnetic Field: Molecular Dynamics, Reaction Kinetics, and Spectroscopy Analysis / **Vesellov M.M.**, Uporov I.V., Efremova M.V., Le-Deygen I.M., Prusov A.N., Shchetinin I.V., Savchenko A.G., Golovin Y.I., Kabanov A.V., Klyachko N.L. // ACS Omega. – 2022. – Vol. 7. – № 24. – P. 20644–20655. (объем 0,8 п.л., авторский вклад 90%) [Импакт-фактор Wos JIF=4,132] doi: 10.1021/acsomega.2c00704.
11. **Vesellov M.M.** et al. Up- and down-regulation of enzyme activity in aggregates with gold-covered magnetic nanoparticles triggered by low-frequency magnetic field / **Vesellov M.M.**,

Efremova M.V., Prusov A.N., Klyachko N.L. // Nanomaterials. – 2024. – Vol. 14. – № 5. – P. 411. (0,8 п.л., авторский вклад 90%) [Импакт-фактор Wos JIF=5,719] doi: 10.3390/nano14050411.

Статья в сборнике

1. Burmistrov I. et al Single domain magnetic nanoparticles as magneto-mechanical actuators for remote drug release from polyelectrolyte microcapsules / Burmistrov I., **Veselov M.**, Mikheev A., Pallaeva T., Bukreeva T., Klyachko N., Trushina D. // Med. Sci. Forum. – 2022. – Vol. 14. – № 1. – P. 90 (0,1 п.л., авторский вклад 40%) doi: 10.3390/ecmc2022-13495 (Полные материалы статьи доступны по ссылке <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ECMC2022-13495/s1>).