

ВЛИЯНИЕ ВЯЗКИХ СРЕД НА КВАНТОВЫЙ ВЫХОД БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ В РЕАКЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗой

© 2024 г. А.Е. Лисица^{*,#}, Л.А. Суковатый^{*}, В.А. Кратасюк^{*,**}, Е.В. Немцева^{*,**}

^{*}Сибирский федеральный университет, Свободный просп., 79, Красноярск, 660041, Россия

^{**}Институт биофизики СО РАН — обособленное подразделение ФИЦ «Красноярский научный центр
Сибирского отделения РАН», Академгородок, 50/50, Красноярск, 660036, Россия

[#]E-mail: ALisitsa@sfu-kras.ru

Поступила в редакцию 06.03.2024 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

На основе данных по нестационарной кинетике биолюминесцентной реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, в средах с полиолами и сахарами с помощью математического моделирования был определен относительный квантовый выход биолюминесценции в этой реакции на молекулу субстратов. Получено, что в некоторых средах относительный квантовый выход на молекулу альдегида растет по сравнению со значением в буфере: на 18% в присутствии глицерина и на 33% — в присутствии сахарозы. Методами молекулярной динамики была проанализирована конформация боковой цепи α His44 — важного для катализа остатка бактериальных люцифераз. Установлено, что в присутствии всех соразтворителей наблюдается повышение вероятности образования оптимальной для катализа конформации этого аминокислотного остатка, что может способствовать наблюдаемому увеличению квантового выхода биолюминесценции изучаемой реакции в вязких средах.

Ключевые слова: бактериальная биолюминесценция, квантовый выход биолюминесценции, люцифераза, эффект среды.

DOI: 10.31857/S0006302924030047, EDN: OFZRRCR

Излучение света живыми организмами (биолюминесценция) происходит в результате окислительно-восстановительных реакций, катализируемых специальными ферментами — люциферазами. Биолюминесцентная реакция бактерий представляет собой проходящее через несколько стадий окисление восстановленного флавинонуклеотида (FMNH₂) и длинноцепочечного альдегида (RCOH) кислородом воздуха (O₂), с образованием окисленной формы флавина (FMN), карбоновой кислоты (RCOOH) и кванта света ($h\nu$) (рис. 1) [1]. Ключевыми интермедиатами реакции считаются комплексы бактериальной люциферазы с FMNH₂ (Интермедиат I), 4а-гидропероксифлавином, FMNOOH (Интермедиат II), 4а-пероксиполуацеталь-флавином (Интермедиат IIa), и 4а-гидроксифлавином, FMNOH (Интермедиат III) [2]. FMNH₂ и Интермедиат II являются неустойчивыми соединениями и в присутствии молекулярного кислорода подвержены темновому распаду с образованием FMN и перекиси водорода [1].

Эффективность биолюминесцентных реакций оценивают с помощью такого параметра, как квантовый выход биолюминесценции Q_{bl} , который равен количеству квантов света, излучаемых на одну молекулу люциферазы или субстрата, вступивших в реакцию, либо на одну молекулу продукта, образовавшегося в реакции [3, 4]. *In vitro* реакция, катализируемая бактериальной люциферазой, характеризуется довольно низким квантовым выходом биолюминесценции, что, вероятно, обусловлено сложной кинетической схемой и наличием темновых стадий. Так, для реакции, катализируемой люциферазой *Photobacterium phosphoreum*, с деканалем было получено $Q_{bl} = 0.13$ (на молекулу декановой кислоты) [5], а для реакции, катализируемой люциферазой *Photobacterium leiognathi*, с тетрадеканалем было определено $Q_{bl} = 0.21$ (на молекулу миристиновой кислоты) [6]. Низкий квантовый выход биолюминесцентной реакции бактерий затрудняет ее применение для биолюминесцентной визуализации клеток и заставляет исследователей искать пути увеличения ее яркости, например, путем со-

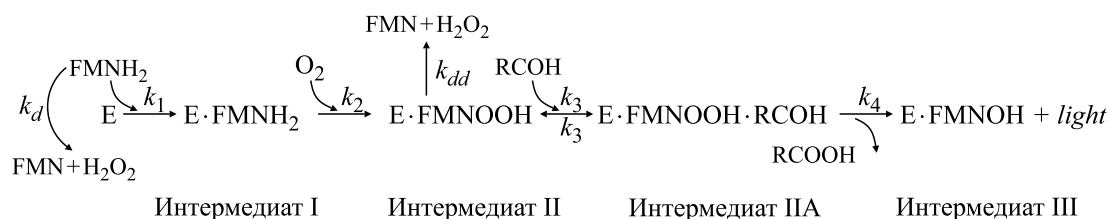


Рис. 1. Кинетическая схема биолюминесцентной реакции бактерий: Е — люцифераза, остальные обозначения расшифрованы в тексте.

здания химерной люциферазы с присоединенным антенным белком [7].

Варьируя физико-химические условия проведения биолюминесцентной реакции (рН, температура, состав среды, и другие), можно наблюдать увеличение или уменьшение интенсивности излучаемого света. Однако такие изменения могут быть обусловлены кинетическими механизмами и не отражать изменение квантового выхода биолюминесценции в реакции как такового. В работе [6] было показано, что для реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, с тетрадеканалем присутствие в среде небольших концентраций органических растворителей приводит к изменению отношения испускаемых квантов света к количеству продуцируемых молекул карбоновой кислоты: в присутствии 1% диметилсульфоксида и 0.15% ацетона квантовый выход на молекулу миристиновой кислоты снижается от 0.21 до 0.13 и 0.04 соответственно.

В общем случае влияние конденсированных сред на (био)химические реакции может реализовываться через изменение динамики молекул (скорости конформационных переходов) вследствие вязкостного сопротивления среды. Поэтому вариацию вязкости широко используют для исследования тонкостей механизмов молекулярных трансформаций и движений молекулярных фрагментов в самых разнообразных системах — от ферментативных процессов [8] до молекулярных моторов [9] и стереоселективных химических взаимодействий [10, 11]. Эффективным способом разделения влияния собственно вязкости и других свойств среды оказывается применение широкого спектра соразтворителей, изменяющих вязкость раствора. В наших предыдущих работах [12–14] был изучен эффект вязких сред на основе ряда полиолов и сахаров на скорость отдельных стадий реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, представленной на рис. 1. С повышением вязкости среды были выявлены диффузионные ограничения скоростей некоторых стадий (k_1 , k_d , k_{dd}), но каталитическая константа k_4 оказалась не зависящей от вязкости, проявляя рост в средах с сорбитолом, глюкозой и сахарозой. Однако проведенное детальное исследование кинетических характеристик реакции не позволило

получить в явном виде ответ на вопрос, как изменяется квантовый выход бактериальной биолюминесценции в вязких средах.

Целью данной работы было оценить влияние вязких сред на основе полиолов и сахаров на квантовый выход биолюминесценции в реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*. Для этого на основе определенных ранее констант скоростей отдельных стадий реакции было рассчитано количество фермента и субстратов, участвующих в реакции в разных средах, и соотнесено с количеством испускаемого света. Это позволило оценить изменение квантового выхода биолюминесценции реакции по сравнению со стандартными условиями (буферный раствор).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение количества света, испускаемого в биолюминесцентной реакции. Для расчета относительного квантового выхода биолюминесценции в реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, в вязких средах с этиленгликолем, глицерином, сорбитолом, глюкозой, сахарозой и декстраном были использованы данные по нестационарной кинетике реакции, полученные ранее [13, 14]. Коротко, методика получения кинетических кривых методом остановленного потока состояла в следующем: при помощи анализатора кинетики быстрых процессов SX-20 (Applied Photophysics, Великобритания) смешивали 1.9 мкМ люциферазы *P. leiognathi* (ИБФ СО РАН) с раствором субстратов — 30 мкМ FMNH₂ и 20–100 мкМ деканала — и регистрировали изменение интенсивности биолюминесценции (I_{bl}) в виде вспышки, завершающейся за <15 с (примеры кинетических кривых приведены на рис. 2а). Эксперименты проводили при 20°C в К-На-фосфатном буфере (рН 6.9, 0.05 М) и в вязких средах (буферных растворах с 10–40 вес. % этиленгликоля, глицерина, сорбитола, глюкозы и сахарозы, или 5–15 вес. % декстрана со средней молекулярной массой 70 кДа).

Интенсивность биолюминесценции регистрировали с помощью ФЭУ R6095 (Hamamatsu Photonics, Япония), закрепленного непосредственно

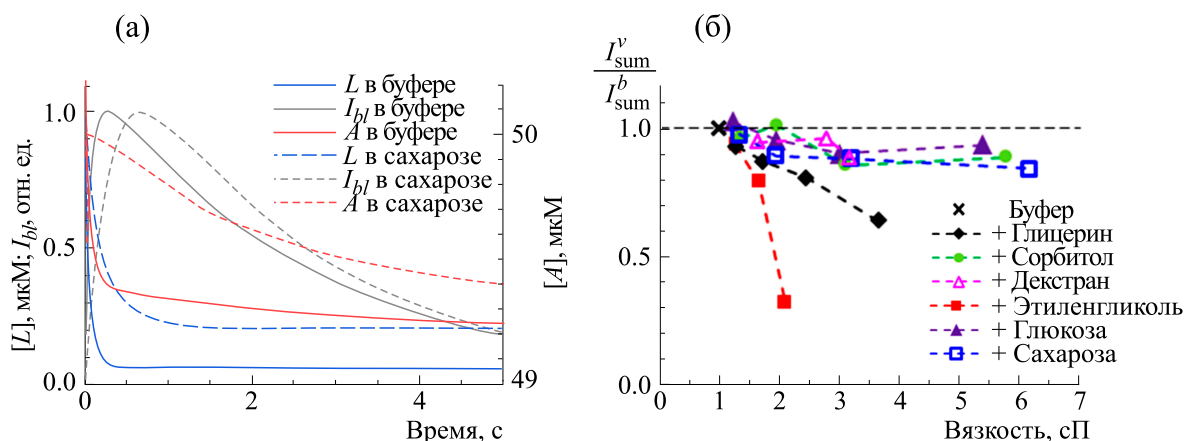


Рис. 2. (а) — Изменение интенсивности биоломинесценции I_{bl} (нормировано на максимум) и концентрации люциферазы (по левой оси ординат) и деканала (по правой оси ординат) в реакционной смеси в ходе реакции, катализируемой ферментом *P. leiognathi*, в буфере и в сахарозе (40%); приведены данные для эксперимента с 50 мкМ

деканала. (б) — Относительная интегральная интенсивность биоломинесцентной реакции $\frac{I_{sum}^v}{I_{sum}^b}$ в разных средах.

на измерительной ячейке прибора, без ограничения спектрального диапазона регистрации. Таким образом, за меру количества света, излученного в реакции, принималось значение интенсивности люминесценции (в условных единицах), полученное во всем спектральном диапазоне (450–550 нм). Интегральную интенсивность, испущенную реакционной смесью за один оборот фермента, I_{sum} , рассчитывали как площадь под кинетической кривой.

Определение относительного квантового выхода биоломинесценции в вязких средах. Количество люциферазы (L) и субстратов (F — восстановленного флавинмононуклеотида и A — деканала), вступившее в реакцию в разных средах, было рассчитано по изменению их концентраций в ходе реакции, что стало возможным благодаря знанию констант скоростей отдельных стадий реакции. В нашей предыдущей работе [13] детально описано, что для определения констант скоростей отдельных стадий реакции кинетические кривые, полученные в каждой из сред при пяти концентрациях деканала (10, 20, 30, 40 и 50 мкМ), были аппроксимированы в пакете Scilab (Scilab Enterprises, Франция) с помощью математической модели, разработанной на основе схемы, приведенной на рис. 1. В данной работе кинетические параметры были использованы для определения изменения концентрации компонентов в ходе реакции (рис. 2а), на основе чего было рассчитано количество люциферазы и альдегида, вступивших в реакцию (L_r и A_r), как разность между начальной (в момент времени 0 с) и конечной (в момент времени 10 с)

концентрациями этих компонентов. В условиях постоянного объема реакционной смеси отношение концентраций компонента в вязкой среде и буфере были равны отношению его количеств. Количество $FMNH_2$, вступившего в реакцию, считали равным количеству фермента: $F_r = L_r$, что позволило исключить влияние неферментативного окисления $FMNH_2$ (процесс k_d на рис. 1) на оценку F_r .

Для каждой концентрации соразтворителя был рассчитан относительный квантовый выход биоломинесценции на одну молекулу люциферазы (Q_L^{rel}) и деканала (Q_A^{rel}) по формулам:

$$Q_L^{rel} = \frac{I_{sum}^v}{L_r^v} : \frac{I_{sum}^b}{L_r^b} = \frac{I_{sum}^v}{I_{sum}^b} : \frac{L_r^v}{L_r^b}, \quad (1)$$

$$Q_A^{rel} = \frac{I_{sum}^v}{A_r^v} : \frac{I_{sum}^b}{A_r^b} = \frac{I_{sum}^v}{I_{sum}^b} : \frac{A_r^v}{A_r^b}, \quad (2)$$

где I_{sum}^v и I_{sum}^b — интегральные интенсивности биоломинесценции в вязкой среде и буфере соответственно (рис. 2б); L_r^v и L_r^b — количество люциферазы, связавшей $FMNH_2$, в вязкой среде и буфере соответственно; A_r^v и A_r^b — количество альдегида, связавшегося с Интермедиатом II, в вязкой среде и буфере соответственно. Относительный квантовый выход на одну молекулу $FMNH_2$ был равен параметру, рассчитанному на одну молекулу люциферазы: $(Q_F^{rel}) = (Q_L^{rel})$. Для каждой среды было получено пять значений (Q_A^{rel})

(для концентраций деканала 10, 20, 30, 40 и 50 мкМ), на основе которых были рассчитаны среднее значение и стандартное отклонение.

Расчет молекулярной динамики люциферазы в различных средах. Трехмерная структура бактериальной люциферазы *P. leiognathi* была получена методом реконструирования по гомологии с помощью веб-сервиса SWISS-MODEL [15], как детально описано в работе [14]. Шаблоном являлась кристаллическая структура люциферазы *V. harveyi* (PDB ID 3FGC) [16]. Расчет молекулярной динамики реконструированной структуры люциферазы при температуре 300 К и давлении 10^5 Па был проведен в программном пакете GROMACS 2020.4 [17]. Моделируемая система представляла собой бокс с молекулой люциферазы, окруженной либо только молекулами воды, либо смесью воды с соразтворителями: этиленгликолем (30 вес. %), глицерином (40 вес. %), сорбитолом (40 вес. %), глюкозой (40 вес. %) и сахарозой (40 вес. %). Для описания топологии всех типов атомов в моделируемых системах было использовано силовое поле CHARMM36 [18]. Подготовка систем (нейтрализация заряда, минимизация энергии методом наискорейшего спуска, релаксации системы при изохорно-изотермических и изотермо-изобарических условиях) подробно описана в работе [14]. Расчет молекулярной динамики каждой из систем проводили для 100 нс, с тремя независимыми запусками, включая этапы минимизации и релаксации. Анализ значений углов χ_1 и χ_2 боковой цепи аминокислотного остатка α His44 проводили с помощью программного пакета MDAnalysis [19,20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение квантового выхода биолюминесценции в вязких средах. С использованием математической модели, описывающей многостадийную кинетику реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, было определено влияние вязких сред на количество фактически участвующих в реакции молекул фермента, FMNH₂ и деканала. Ранее было установлено, что в вязких средах замедляются как некоторые стадии основного (светового) пути, так и конкурирующие темновые процессы [12–14], поэтому вопрос о результирующем влиянии сред на концентрацию образующихся интермедиатов реакции не является тривиальным. Расчеты показали, что несмотря на замедление неферментативного окисления FMNH₂ вязкими средами наблюдается снижение количества Интермедиата I в реакции (равного F_T и L_T) по сравнению с буферным раствором (рис.

3а). В присутствии большинства соразтворителей этот эффект не превышает 30%. Однако этиленгликоль в максимальной концентрации (30%) значительно снижает F_T и L_T (на 66%).

В наших предыдущих работах было получено, что конкурирующие стадии с константами скорости k_1 и k_d являются диффузионно-контролируемыми, то есть зависимость их значений от вязкости среды η описывается степенной функцией [12–14]. Однако показатель степенных зависимостей варьирует для разных сред: для $k_d(\eta)$ он равен около -0.84 для всех изученных соразтворителей, в то время как для $k_1(\eta)$ в средах с этиленгликолем и глицерином показатель принимает значения около -1.80 , а в остальных — около -1.00 [14]. Судя по всему, различие показателей степенной зависимости констант скоростей этих процессов от вязкости приводит к тому, что в присутствии соразтворителей меньшее количество молекул люциферазы связывает восстановленный флавиномононуклеотид и впоследствии формирует электронно-возбужденный интермедиат реакции.

Схожая картина наблюдается для количества связавшегося альдегида A_T (рис. 3б): в вязких средах в реакции участвует на $\leq 20\%$ меньше этого субстрата, чем в буфере (за исключением сред с максимальным содержанием глицерина и этиленгликоля, где эффект выражен сильнее). Различия между данными для флавина и альдегида (рис. 3а,б) объясняются тем, что константа ассоциации альдегида (скорость образования Интермедиата II) зависит от концентрации соразтворителей сложным образом и не объясняется диффузионными ограничениями [14].

По формулам (1) и (2) был рассчитан относительный квантовый выход биолюминесценции в реакции на молекулу фермента и субстратов — FMNH₂ и деканала. Полученные значения представлены на рис. 3в,г и в табл. 1. Установлено, что относительный квантовый выход изменяется на $< 33\%$, и это изменение не зависит от вязкости среды как таковой.

Присутствие соразтворителей в среднем увеличивает относительный квантовый выход на молекулу альдегида, при этом наибольший эффект наблюдается для среды с 40%-й сахарозой (рис. 3г). Относительный квантовый выход биолюминесценции на молекулу люциферазы и флавина для некоторых сред принимает значения ≤ 1 (рис. 3в), но это лишь кажущийся эффект, поскольку фактически только часть Интермедиата I в дальнейшем свяжется с альдегидом.

Ранее было показано, что константа скорости формирования электронно-возбужденного интермедиата биолюминесцентной реакции бактерий (k_4) не зависит от вязкости среды и демон-

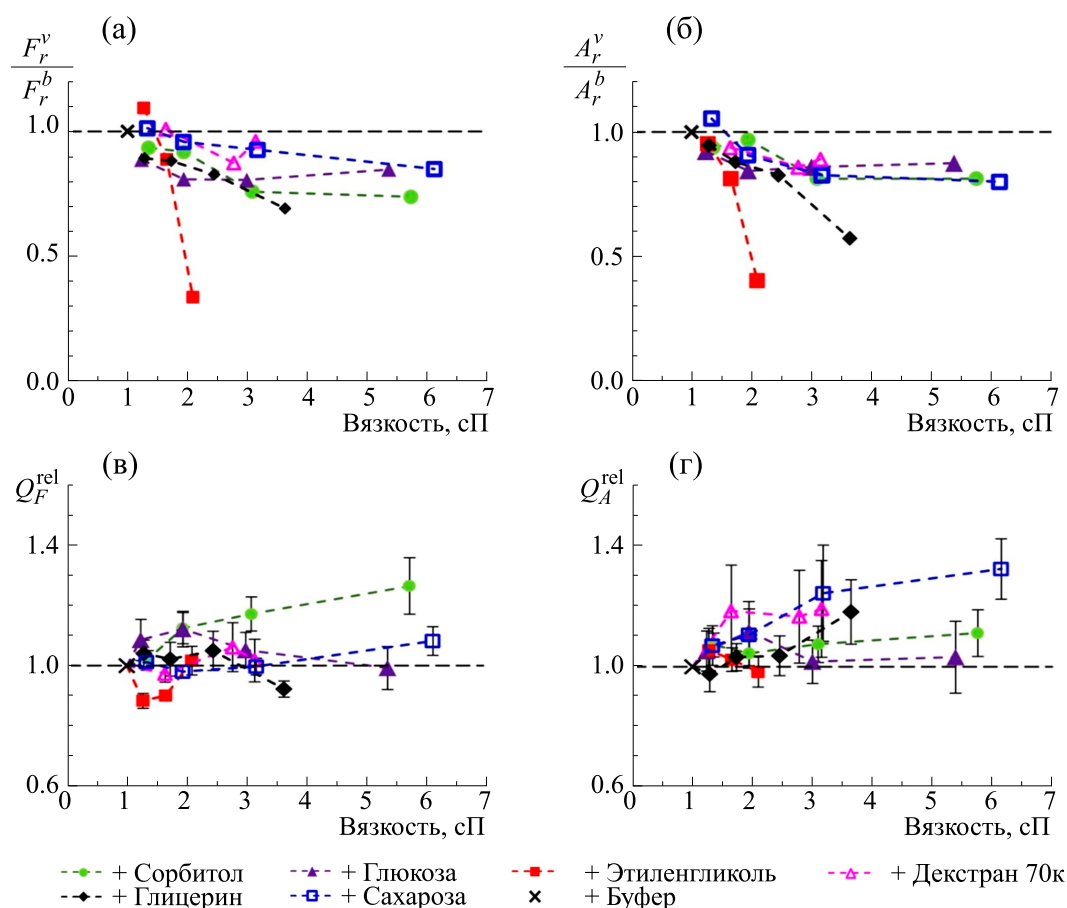


Рис. 3. Зависимость относительного количества FMNH₂, $\frac{F_r^v}{F_r^b}$ (а) и деканала, $\frac{A_r^v}{A_r^b}$ (б), вступивших в реакцию, а также относительного квантового выхода биолюминесценции на молекулу FMNH₂, Q_F^{rel} (в) и деканала, Q_A^{rel} (г) от вязкости среды в присутствии разных полиолов и сахаров. Параметры рассчитаны относительно значений в буфере (вязкость 1 сП).

стрирует специфику относительно выбранного соразворителя [13, 14]. Так, в средах с этиленгликолем и декстраном наблюдалось уменьшение k_4 , в средах с глицерином влияние отсутствовало, а в присутствии сорбитола, глюкозы и сахарозы происходило увеличение скорости данной стадии. Например, в растворе 40%-й сахарозы k_4 увеличивается на порядок по сравнению с значением в буфере. Отсутствие корреляций между каталитической константой фермента (k_4) и квантовым выходом биолюминесценции в присутствии соразворителей может говорить о том, что структурные факторы, определяющие высокую скорость реакции и ее высокую эффективность, разные. В частности, на функциональные свойства бактериальных люцифераз влияет изменение средой подвижности мобильной петли фермента, участвующей в стабилизации интермедиатов ре-

акции [21, 22]. Получается, что в условиях повышения вязкости цитоплазмы бактерий поддержание высокого уровня свечения происходит в большей степени за счет увеличения числа оборотов люциферазы, чем за счет повышения эффективности каждого каталитического акта.

В общем случае квантовый выход биолюминесценции, Q_{bl} , представляет собой вероятность высвечивания кванта света в течение одного каталитического акта люциферазы. Он зависит от вероятности образования продукта реакции, определяемой соотношением скоростей основного светового пути и «темновых» процессов, (Q_{chem}), вероятности образования продукта реакции в электронно-возбужденном состоянии (Q_{ees}) и вероятности излучательной дезактивации электронно-возбужденного эмиттера, что по сути яв-

Таблица 1. Относительный квантовый выход биолюминесценции в реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, на молекулу фермента (Q_L^{rel}), FMNH₂ (Q_F^{rel}) и деканала (Q_A^{rel}), в вязких средах с разными соразтворителями. Параметры рассчитаны относительно значений в буфере

№	Соразтворитель, вес. %	Относительный квантовый выход биолюминесценции	
		$Q_F^{\text{rel}} = Q_L^{\text{rel}}$, отн. ед.	Q_A^{rel} , отн. ед.
1	Этиленгликоль:		
	10	0.88 ± 0.02	1.06 ± 0.07
	20	0.90 ± 0.01	1.02 ± 0.04
	30	1.02 ± 0.05	0.98 ± 0.05
2	Глицерин:		
	10	1.04 ± 0.04	0.98 ± 0.06
	20	1.02 ± 0.06	1.03 ± 0.05
	30	1.05 ± 0.06	1.04 ± 0.07
	40	0.92 ± 0.03	1.18 ± 0.11
3	Сорбитол:		
	10	1.02 ± 0.03	1.07 ± 0.04
	20	1.12 ± 0.05	1.04 ± 0.04
	30	1.17 ± 0.06	1.08 ± 0.06
	40	1.26 ± 0.09	1.11 ± 0.08
4	Глюкоза:		
	10	1.09 ± 0.07	1.05 ± 0.07
	20	1.12 ± 0.06	1.12 ± 0.08
	30	1.05 ± 0.06	1.02 ± 0.07
	40	0.99 ± 0.07	1.03 ± 0.12
5	Сахароза:		
	10	1.01 ± 0.03	1.07 ± 0.07
	20	0.98 ± 0.02	1.11 ± 0.11
	30	1.00 ± 0.03	1.24 ± 0.16
	40	1.08 ± 0.05	1.33 ± 0.10
6	Декстран 70 кДа:		
	5	0.97 ± 0.03	1.18 ± 0.15
	12.5	1.06 ± 0.08	1.17 ± 0.15
	15	1.02 ± 0.07	1.19 ± 0.16

ляется квантовым выходом фотолюминесценции эмиттера (Q_{fl}):

$$Q_{\text{bl}} = Q_{\text{chem}} \cdot Q_{\text{ees}} \cdot Q_{\text{fl}}. \quad (3)$$

Кинетическая модель биолюминесцентной реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, которую мы использовали для исследования влияния вязкости среды (рис. 1), не позволяет разделить вклады условных химической (Q_{chem} и Q_{ees}) и фотофизической (Q_{fl}) стадий в интенсивность испускаемого света.

В таблице 2 представлены опубликованные к настоящему моменту абсолютные значения квантового выхода биолюминесценции в реакции, катализируемой люциферазой бактерий. Видно, что наиболее разносторонне изучена реакция, катализируемая люциферазой *A. fischeri*: для альдегидов с длиной цепи 8–14 углеродных атомов бы-

ли получены квантовые выходы от 0.091 до 0.164 [4]. Несмотря на то, что этот фермент также относится к подсемейству «быстрых» люцифераз, как люциферазы *P. phosphoreum* и *P. leiognathi* [23], для последних был зарегистрирован чуть более высокий квантовый выход биолюминесценции (0.20 и 0.21 соответственно). Если использовать эти данные, то можно оценить, что для изученной нами реакции в среде с 40%-й сахарозой квантовый выход биолюминесценции составляет около 0.28.

Влияние соразтворителей на конформацию каталитически важного гистидинового остатка люциферазы. Наши предыдущие исследования структурно-динамических характеристик бактериальной люциферазы в присутствии полиолов и сахаров [12–14] показали, что все соразтворители, за исключением этиленгликоля, не оказывают заметного влияния ни на укладку белковой

Таблица 2. Абсолютные значения квантового выхода биолюминесценции, определенные к настоящему времени для разных видов бактериальных люцифераз

№	Люцифераза	Компонент, по которому определяли квантовый выход	Q_{bl}
1.	<i>Aliivibrio fischeri</i>	FMNH ₂	0.3 [26], 0.28 [27], 0.047* [28]
		H ₂ O ₂	0.12* [28]
		Декановая кислота	0.13* [5]
		Гексаналь	0.002 [4]
		Октаналь	0.091 [4]
		Нонаналь	0.161 [4]
		Деканаль	0.155 [4], 0.10* [28]
		Ундеканаль	0.144 [4]
		Додеканаль	0.150 [4]
		Тетрадеканаль	0.164 [4]
2.	<i>P. phosphoreum</i>	Люцифераза	0.2 [#] [3,29]
3.	<i>P. leiognathi</i>	Миристиновая кислота	0.21* [6]
4.	<i>Vibrio harveyi</i>	Интермедиат II	0.16 ^{&} , 0.2 [@] [30]

Примечание. * — По люминольному стандарту; # — по радиоактивному стандарту; & — для интермедиата, выделенного при отрицательных температурах; @ — для интермедиата, выделенного при 0°C.

глобулы (по таким параметрам, как радиус инерции белка, площадь поверхности, доступной растворителю, и др.), ни на динамику (по такому параметру, как среднеквадратичная флуктуация C_α-атомов). Анализ конформации боковых цепей аминокислотных остатков, участвующих в связывании субстратов, также не выявил влияния соразтворителей [24]. Это выглядит закономерным результатом, поскольку исследованные соразтворители являются природными осмолитами — молекулами с защитной функцией, которые накапливаются клетками в неблагоприятных условиях среды [25].

В данной работе с помощью методов молекулярной динамики для люциферазы, окруженной молекулами воды и смесью воды с соразтворителями, мы проанализировали конформацию боковой цепи αHis44, располагающегося глубоко в полости активного центра фермента. В недавней работе [31] было показано, что образование 4а-пероксиполуацеталь-флавина (Интермедиата IIА) в активном центре бактериальной люциферазы происходит с участием этого аминокислотного остатка, который вместе с молекулой воды выступает в роли акцептора протона. Распределение двугранных углов χ_1 и χ_2 αHis44 в ходе молекулярной динамики в разных модельных системах представлено на рис. 4. Было получено, что, когда белок окружен только молекулами воды, гистидин может находиться со сходной вероятностью в двух конформациях: конформация 1 с углами χ_1 и

χ_2 около 200° и 90° соответственно и конформация 2 — с углами χ_1 и χ_2 около 280° и 270° соответственно (рис. 4а). αHis44 является высоко консервативным аминокислотным остатком для бактериальных люцифераз [23], играющим важную роль в их биолюминесцентной активности [32]. Конформация 1 соответствует ориентации боковой цепи этого остатка в кристаллической структуре люциферазы *V. harveyi* (PDB ID 3FGC), отмеченной на рис. 4 треугольным маркером [16]. QM/ММ расчеты для этой структуры показали, что такое положение является наиболее оптимальным для процесса образования электронно-возбужденного 4а-гидроксифлавина из 4а-пероксиполуацеталь-флавина [33].

Мы установили, что в присутствии всех соразтворителей наблюдается снижение вероятности образования конформации 2 (рис. 4б–е). В присутствии же этиленгликоля происходит расщепление конформации 1 на две подгруппы по углу χ_1 (рис. 4б). Учитывая, что именно конформация 1 является наиболее оптимальной для каталитической активности люциферазы, можно предположить, что большая вероятность этого состояния в средах с соразтворителями по сравнению с водным окружением способствует наблюдаемому увеличению квантового выхода биолюминесценции в изучаемой реакции. Наш предыдущий анализ присутствия молекул соразтворителей в полости активного центра показал, что ко дну полости, где расположен αHis44, имеют доступ только

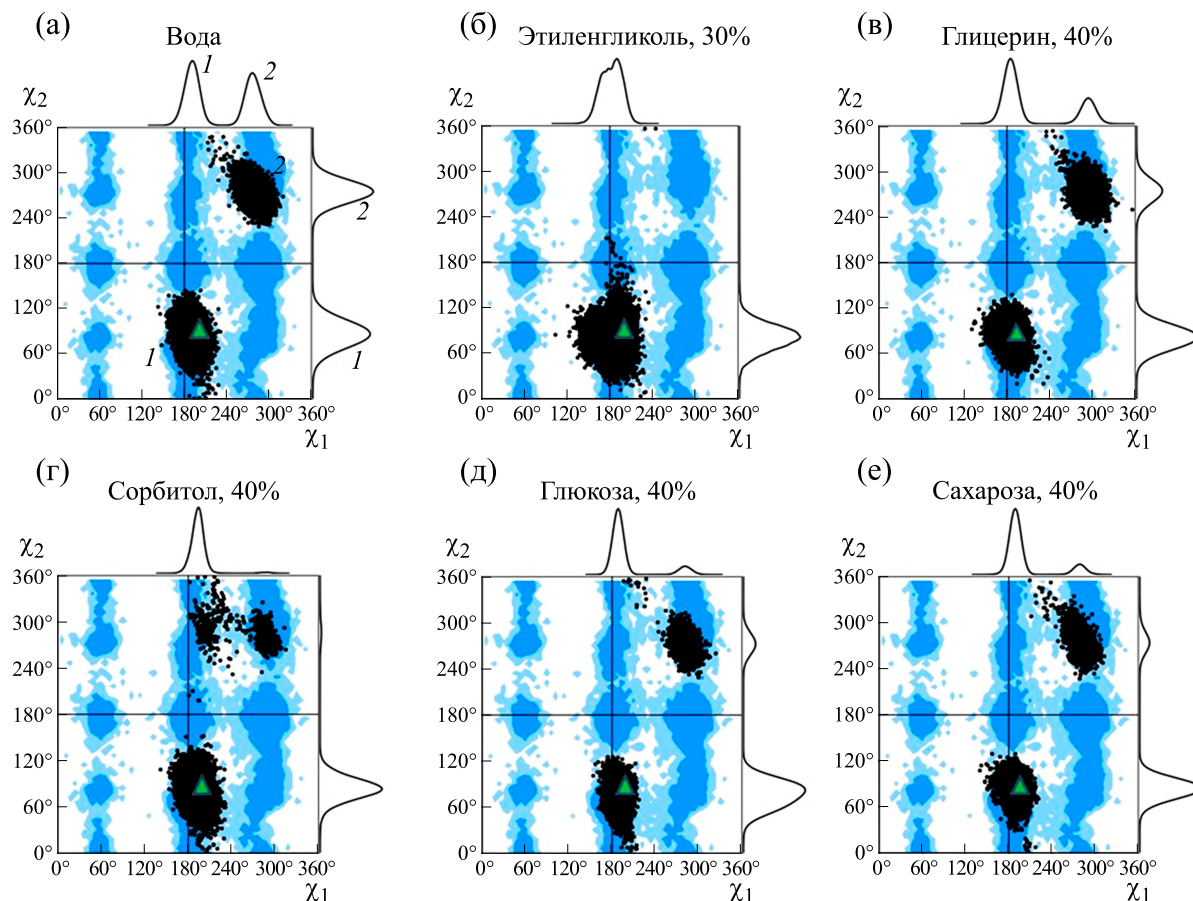


Рис. 4. Вариация двугранных углов χ_1 и χ_2 α His44 люциферазы *P. leiognathi* в ходе молекулярной динамики в разных модельных системах в двумерном представлении (точки) и в виде частотного распределения (линии около контура рисунка): (а) — вода; (б) — этиленгликоль, 30%; (в) — глицерин, 40%; (г) — сорбитол, 40%; (д) — глюкоза, 40%; (е) — сахароза, 40%. Для каждой модели показаны результаты трех повторностей (3000 фреймов). Треугольным маркером отмечена конформация гистидина в кристаллической структуре люциферазы *V. harveyi* (PDB ID 3FGC) ($\chi_1 = 185^\circ$, $\chi_2 = 90^\circ$). Синие поля — доступное положение боковых цепей любых аминокислотных остатков согласно библиотеке [34].

самые маленькие соразтворители — этиленгликоль и глицерин [14]. Сорбитол и глюкоза могут подойти близко (на расстояние образования водородной связи) только к менее углубленным участкам связывания флавина, а самая массивная молекула сахарозы не способна проникать в полость активного центра и располагается около ее входа [14]. Таким образом, оказалось, что физическое присутствие молекул соразтворителей в непосредственной близости от исследованного гистидина не является необходимым условием для влияния среды на его конформацию. Влияние может быть опосредованным, через цепочку взаимодействующих аминокислотных остатков или путем воздействия на мобильность и структуру водородных связей молекул воды в активном центре.

Среди изученных соразтворителей наибольший эффект на биoluminesцентную реакцию оказывал этиленгликоль: при его максимальной концентрации (30%) наблюдалось значительное снижение количества образовавшихся интермедиатов (рис. 3а,б) и, как следствие, интегральной интенсивности биoluminesценции (рис. 2б). Ранее мы показали, что в присутствии этого полиола происходит изменение структуры бактериальной люциферазы (увеличивается радиус инерции и площадь поверхности, доступной растворителю) [14], что, вероятно, связано с маленьким молекулярным размером и высокой долей гидрофобной поверхности этого соединения. Кроме того, было показано, что этиленгликоль лучше всех остальных соразтворителей проникает в полость активного центра фермента, достигая глубоко лежащих сайтов связывания флавина [24], что также вносит вклад в эффекты этого сораз-

творителя на биолюминесцентную реакцию бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы сравнили влияние вязких сред на основе полиолов и сахаров на кинетические свойства биолюминесцентной реакции бактерий (скорости отдельных стадий) и эффективность образования света в ходе катализа (квантовый выход биолюминесценции). Для этого было рассчитано относительное количество субстратов, участвующих в реакции, катализируемой люциферазой *P. leiognathi*, в разных средах, и проведена оценка количества света, излученного на одну молекулу субстрата, относительно реакции в невязком буферном растворе. Ранее было показано, что в вязких средах с сорбитолом, глюкозой и сахарозой наблюдается увеличение скорости катализа. Однако оценка квантового выхода биолюминесценции показала гораздо более слабое его увеличение в исследованных средах. Наибольший эффект на относительный квантовый выход на молекулу альдегида (увеличение на 33%) оказывает среда с сахарозой – самым массивным из использованных низкомолекулярных сорастворителей. Для оценки влияния сорастворителей на конформацию каталитически важных аминокислотных остатков активного центра люциферазы с помощью методов молекулярной динамики была рассмотрена ориентация боковой группы α His44 фермента в разных средах. Анализ показал, что в присутствии всех полиолов и сахаров наблюдается увеличение вероятности нахождения гистидина в более выгодной для катализа конформации. При этом не важно, приближается ли сорастворитель к гистидиновому остатку на расстояние водородной связи (как этиленгликоль или глицерин) или не имеет никакого доступа в полость активного центра (как сахароза).

В целом, результаты проведенного исследования говорят о том, что в условиях повышения вязкости цитоплазмы бактерий поддержание высокого уровня свечения может происходить в большей степени за счет увеличения числа оборотов люциферазы, чем за счет улучшения эффективности каждого каталитического акта.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование частично выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (государственное задание № FWES-2024-0018).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee J., *Bioluminescence, the nature of the light* (University of Georgia, 2020).
2. Немцева Е. В. и Кудряшева Н. С. Механизм электронного возбуждения в биолюминесцентной реакции бактерий. *Успехи химии*, **76** (1), 101–112 (2007).
3. Nakamura T. and Matsuda K. Studies on luciferase from *Photobacterium phosphoreum*. I. Purification and physicochemical properties. *J. Biochem.*, **70** (1), 35–44 (1971). DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129624
4. Shimomura O., Johnson F. H., and Kohama Y. Reactions involved in bioluminescence systems of limpet (*Latia neritoides*) and luminous bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69** (8), 2086–2089 (1972). DOI: 10.1073/pnas.69.8.2086
5. McCapra F. and Hysert D. W. Bacterial bioluminescence-identification of fatty acid as product, its quantum yield and a suggested mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52** (1), 298–304 (1973). DOI: 10.1016/0006-291X(73)90987-X
6. Sokolova I. V., Kalacheva G. S., and Tyulkova N. A. Analysis of the ratio of quantum yield and fatty acid formation of *Photobacterium leiognathi* bioluminescence. *Vest. MGU. Khimiya*, **41** (6), 118–120 (2000).
7. Kaku T., Sugiura K., Entani, T., Osabe K., and Nagai T. Enhanced brightness of bacterial luciferase by bioluminescence resonance energy transfer. *Sci. Rep.*, **11** (1), 14994 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-94551-4
8. Kanosue Y., Kojima S., and Ohkata K. Influence of solvent viscosity on the rate of hydrolysis of dipeptides by carboxypeptidase Y. *J. Phys. Org. Chem.*, **17** (5), 448–457 (2004). DOI: 10.1002/poc.752
9. Chen J., Kistemaker J. C., Robertus J., and Feringa B. L. Molecular stirrers in action. *J. Am. Chem. Soc.*, **136** (42), 14924–14932 (2014). DOI: 10.1021/ja507711h
10. Adam W., Diederling M., and Trofimov A. A. V. Intriguing double-inversion stereochemistry in the denitrogenation of 2, 3-diazabicyclo[2.2.1]heptene-type azoalkanes: a model mechanistic study in physical organic chemistry. *J. Phys. Org. Chem.*, **17** (8), 643–655 (2004). DOI: 10.1002/poc.834
11. Adam W., Diederling, M., and Trofimov, A. V. Solvent effects in the photodenitrogenation of the azoalkane diazabicyclo[2.2.1]hept-2-ene: viscosity- and polarity-controlled stereoselectivity in housane formation from the diazenyl diradical. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **4**, 1036–1039 (2002). DOI: 10.1039/B110562K
12. Лисица А. Е., Суковатый Л. А., Кратасюк В. А. и Немцева Е. В. Вязкие среды замедляют распад

- ключевого интермедиата билюминесцентной реакции бактерий. Докл. РАН. Науки о жизни, **492** (1), 320–324 (2020). DOI: 10.31857/S268673892002016X
13. Lisitsa A. E., Sukovatyi L. A., Bartsev S. I., Deeva A. A., Kratasyuk V. A., and Nemtseva E. V. Mechanisms of viscous media effects on elementary steps of bacterial bioluminescent reaction. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (16), 8827 (2021). DOI: 10.3390/ijms22168827
 14. Lisitsa A. E., Sukovatyi L. A., Deeva A. A., Gulnov D. V., Esimbekova E. N., Kratasyuk V. A., and Nemtseva E. V. The Role of Cosolvent–Water Interactions in Effects of the Media on Functionality of Enzymes: A Case Study of *Photobacterium leiognathi* Luciferase. *Life*, **13** (6), 1384 (2023). DOI: 10.3390/life13061384
 15. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tau-riello G., Gumienny R., and Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucl. Acids Res.*, **46** (1) 296–303 (2018). DOI: 10.1093/nar/gky427
 16. Campbell Z. T., Baldwin T. O., and Miyashita O. Analysis of the bacterial luciferase mobile loop by replica-exchange molecular dynamics. *Biophys. J.*, **99**, 4012 (2010). DOI: 10.1016/j.bpj.2010.11.001
 17. Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A. E., and Berendsen H. J. GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.*, **26** (16), 1701 (2005). DOI: 10.1002/jcc.20291
 18. Kim S., Lee J., Jo S., Brooks C. L. III, Lee H. S., and Im W. CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules. *J. Comput. Chem.*, **38** (21), 1879–1886, (2017). DOI: 10.1002/jcc.24829
 19. Michaud-Agrawal N., Denning E. J., Woolf T. B., and Beckstein O. MDAnalysis: a toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.*, **32** (10), 2319–2327 (2011). DOI: 10.1002/jcc.21787
 20. Gowers R. J., Linke M., Barnoud J., Reddy T. J. E., Melo M. N., Seyler S. L., Dotson D. L., Domanski J., Buchoux S., Kenney I. M., and Beckstein O. MDAnalysis, *Proc. 15th Python Sci. Conf.*, **98**, 105 (2016).
 21. Суковатый Л. А., Лисица А. Е., Кратасюк В. А. и Немцева Е. В. Влияние осмолитов на билюминесцентную реакцию бактерий: структурно-динамические аспекты. *Биофизика*, **65** (6), 1135–1141 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920060137
 22. Deeva A. A., Lisitsa A. E., Sukovatyi L. A., Melnik T. N., Kratasyuk V. A., and Nemtseva E. V. Structure-function relationships in temperature effects on bacterial luciferases: Nothing is perfect. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (15), 8119 (2022). DOI: 10.3390/ijms23158119
 23. Deeva A. A., Temlyakova E. A., Sorokin A. A., Nemtseva E. V., and Kratasyuk V. A. Structural distinctions of fast and slow bacterial luciferases revealed by phylogenetic analysis. *Bioinformatics*, **32** (20), 3053–3057 (2016). DOI: 10.1093/bioinformatics/btw386
 24. Суковатый Л. А., Молекулярно-динамический анализ влияния осмолитов на структуру бактериальных люцифераз, Дис. ... канд. ф.-м. н. (Сибирский федеральный университет, 2023).
 25. Фонин А. В., Уверский В. Н., Кузнецова И. М. и Туроверов К. К. Фолдинг и стабильность белка в присутствии осмолитов. *Биофизика*, **61** (2), 222–230 (2016).
 26. Hastings J. W. and Gibson Q. H. Intermediates in the bioluminescent oxidation of reduced flavin mononucleotide. *J. Biol. Chem.*, **238** (7), 2537–2554 (1963). DOI: 10.1016/S0021-9258(19)68004-X
 27. Hastings J. W., Gibson Q. H., and Greenwood C. Evidence for high energy storage intermediates in bioluminescence. *J. Photochem. Photobiol.*, **4** (6), 1227–1241 (1965). DOI: 10.1111/j.1751-1097.1965.tb09309.x
 28. Lee J. Bacterial bioluminescence. Quantum yields and stoichiometry of the reactants reduced flavin mononucleotide, dodecanal, and oxygen, and of a product hydrogen peroxide. *Biochemistry*, **11** (18), 3350–3359 (1972). DOI: 10.1021/bi00768a007
 29. Nakamura A., Okumura J. I. and Muramatsu T. Quantitative analysis of luciferase activity of viral and hybrid promoters in bovine preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, **49** (4), 368–373 (1998). DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199804)49:4<368::AID-MRD3>3.0.CO;2-L
 30. Hastings J. W., Balny C., Peuch C. L. and Douzou P. Spectral properties of an oxygenated luciferase–flavin intermediate isolated by low-temperature chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70** (12), 3468–3472 (1973). DOI: 10.1073/pnas.70.12.3468
 31. Tang Y. Q., Luo Y., Liu Y. J. Theoretical study on role of aliphatic aldehyde in bacterial bioluminescence. *J. Photochem. Photobiol. A*, **419**, 113446 (2021). DOI: 10.1016/j.jphotochem.2021.113446
 32. Tinikul R., Lawan N., Akeratchatapan N., Pimviriyakul P., Chinantuya W., Suadee C., Sucharitakul J., Chenprakhon P., Ballou D. P., and Entsch B. Protonation status and control mechanism of flavin–oxygen intermediates in the reaction of bacterial luciferase. *FEBS J.*, **288** (10), 3246–3260 (2021). DOI: 10.1111/febs.15653
 33. Luo Y. and Liu Y. J. Revisiting the origin of bacterial bioluminescence: QM/MM study on oxygenation reaction of reduced flavin in protein. *ChemPhysChem*, **20** (3), 405–409 (2019). DOI: 10.1002/cphc.201800970
 34. Lovell S. C., Word J. M., Richardson J. S., and Richardson D. C. The penultimate rotamer library. *Prot. Struct. Funct. Bioinf.*, **40** (3), 389–408 (2000). DOI: 10.1002/1097-0134(20000815)40:3<389::AID-PROT50>3.0.CO;2-2

Effect of Viscous Media on the Quantum Yield of Bioluminescence in a Reaction Catalyzed by Bacterial Luciferase

A.E. Lisitsa*, L.A. Sukovatyi*, V.A. Kratasyuk*, **, and E.V. Nemtseva*, **

**Siberian Federal University, Svobodnyi prosp. 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

***Institute of Biophysics, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

Based on previously obtained data on the transient kinetics of the bioluminescent reaction catalyzed by *P. leiognathi* luciferase in media with polyols and sugars, the relative quantum yield of bioluminescence per substrate molecule was determined using mathematical modeling. It was found that in some media the relative quantum yield per aldehyde molecule increases compared to the value in the buffer: by 18% in the presence of glycerol and by 33% in the presence of sucrose. The conformation of the side chain of α His44, which is the functionally important and conservative in all bacterial luciferases, was analyzed using molecular dynamics methods. It has been established that in the presence of all cosolvents there is an increase in the probability of formation the optimal for catalysis orientation of this amino acid, which may contribute to the observed increase in the quantum yield of bioluminescence in viscous media.

Keywords: bacterial bioluminescence, quantum yield of bioluminescence, luciferase, effect of medium