

УДК 577.325.2

## ВЯЗКИЕ СРЕДЫ ЗАМЕДЛЯЮТ РАСПАД КЛЮЧЕВОГО ИНТЕРМЕДИАТА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ БАКТЕРИЙ

© 2020 г. А. Е. Лисица<sup>1,\*</sup>, Л. А. Суковатый<sup>1</sup>, В. А. Кратасюк<sup>1,2</sup>, Е. В. Немцева<sup>1,2</sup>

Представлено академиком РАН И.И. Гительзоном

Поступило 25.10.2019 г.

После доработки 04.02.2020 г.

Принято к публикации 04.02.2020 г.

Исследована скорость распада интермедиата биолюминесцентной реакции бактерий 4а-гидропероксифлавина в зависимости от вязкости среды. Обнаружено, что при низких концентрациях глицерина и сахарозы (вязкость 1.1–1.3 сП) скорость распада увеличивается, а дальнейший рост вязкости до 6.2 сП приводит к уменьшению скорости распада по степенному закону с показателем 0.82–0.84. Методами молекулярной динамики установлено, что в средах с глицерином и сахарозой происходит изменение подвижности аминокислотных остатков активного центра люциферазы, отвечающих за связывание флавина. Полученные результаты говорят о двух разнонаправленных эффектах вязких сред с добавлением глицерина и сахарозы: 1) дестабилизация 4а-гидропероксифлавина за счет изменения структурно-динамических свойств белка, 2) стабилизация этого интермедиата за счет снижения скорости диффузии продуктов его распада.

**Ключевые слова:** бактериальная люцифераза, биолюминесценция, вязкое микроокружение, метод остановленного потока, метод молекулярной динамики, интермедиат ферментативной реакции, диффузионное ограничение

**DOI:** 10.31857/S268673892002016X

Во внутриклеточных условиях (*in vivo*) ферментативные реакции протекают под влиянием многих факторов, которые, как правило, не учитываются при стандартных биохимических исследованиях ферментов (*in vitro*). В частности, вязкость цитоплазмы достигает 2–15 сП в зависимости от типа клеток и их физиологического состояния [1], т.е. значительно превышает вязкость буферных растворов ( $\approx 1$  сП). С точки зрения влияния на метаболические процессы это вызывает, помимо замедления диффузии субстратов и ферментов, изменение структурно-динамических характеристик белков [2], а значит оказывает воздействие на эффективность ферментативных реакций, в том числе через стабилизацию/дестабилизацию их интермедиатов. Поэтому для понимания принципов работы метаболических цепочек в условиях *in vivo* актуальным является изучение механизмов эффектов вязких, негомогенных сред (в том числе, содержащих биомакромолекулы [2, 3]) на интермедиаты фер-

ментативных систем. В данной работе исследовано влияние вязких сред на скорость распада 4а-гидропероксифлавина в реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, относящейся к классу флавиновзависимых монооксигеназ.

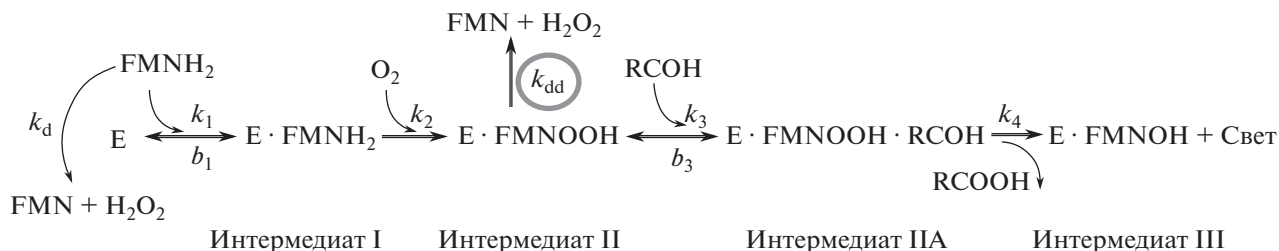
В бактериях флавиновзависимые монооксигеназы участвуют в метаболизме ароматических и алифатических соединений, биосинтезе антибиотиков и других важных процессах [4]. Эти ферменты катализируют окисление субстратов с использованием реактивного интермедиата, 4а-гидропероксифлавина [5]. Ускорение распада 4а-гидропероксифлавина приводит не только к снижению активности фермента, но и к увеличению концентрации перекиси водорода в клетке.

Бактериальная люцифераза отличается от других флавиновзависимых монооксигеназ тем, что одним из продуктов катализируемой ею реакции является квант света в видимом диапазоне. Основной (световой) путь реакции, катализируемой люциферазой, проходит через ряд стадий (рис. 1), таких как: связывание FMNH<sub>2</sub> ( $k_1/b_1$ ), реакция флавина с O<sub>2</sub> ( $k_2$ ), связывание альдегидного субстрата RCOH ( $k_3/b_3$ ) и образование электронно-возбужденного интермедиата с последующим испусканием кванта света ( $k_4$ ) [6].

<sup>1</sup> Сибирский Федеральный Университет, Красноярск, Россия

<sup>2</sup> Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, Россия

\*e-mail: Alisitsa@sfn-kras.ru



**Рис. 1.** Стадии реакции, катализируемой бактериальной люциферазой [6]: E – люцифераза, O<sub>2</sub> – молекулярный кислород, FMNOOH – 4а-гидропероксифлавин, RCOOH – карбоновая кислота. Остальные обозначения расшифрованы в тексте.

Распад интермедиата II, 4а-гидропероксифлавина, ( $k_{dd}$ , рис. 1) оказывает существенное влияние на эффективность реакции [7]. От  $k_{dd}$  зависит константа спада свечения – показатель, характеризующий нестационарную кинетику данной реакции, на основе которого люциферазы бактерий подразделяют на “быстрые” и “медленные” ферменты [8, 9]. Характер влияния вязких сред на стабильность интермедиата II биолуминесцентной реакции бактерий в настоящее время еще не установлен.

В работе использовали: лиофилизированный препарат люциферазы *Photobacterium leiognathi* (ООО “Биолумдиагностика”, Россия), флавинмононуклеотид (FMN) (Sigma, Германия), EDTA (ROTH, Германия), сахарозу и глицерин (Panpharm, Германия), соли для фосфатного буфера (0.05 M, pH 6.8) – Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fluka, Германия).

Кинетику реакции регистрировали методом остановленного потока на анализаторе SX-20 (Applied Photophysics, Великобритания) по изменению оптической плотности при 445 нм (D<sub>445</sub>) при 20°C. Реакцию запускали по известной методике [7], смешивая обескислороженный раствор люциферазы (6 мкМ) и фотовосстановленного флавинмононуклеотида (FMNH<sub>2</sub>, 30 мкМ), с буфером, содержащим растворенный O<sub>2</sub> (≈240 мкМ). Вязкость изменяли, добавляя в оба раствора 5–40 wt % глицерина или сахарозы. Обескислороживание проводили барботированием аргоном в течение 10 мин. Константы скорости  $k_d$  и  $k_{dd}$  определяли с погрешностью ≤10% путем аппроксимации участков кинетической кривой согласно рис. 2а, с помощью Origin 8.1 (OriginLab).

Молекулярную динамику бактериальной люциферазы (*Vibrio harveyi*, PDB: 3FGC) [10] в окружении воды и 5–40 wt % сахарозы/глицерина рассчитывали в течение 40 нс с помощью пакета GROMACS 5.1.4 (силовое поле CHARMM36) [11].

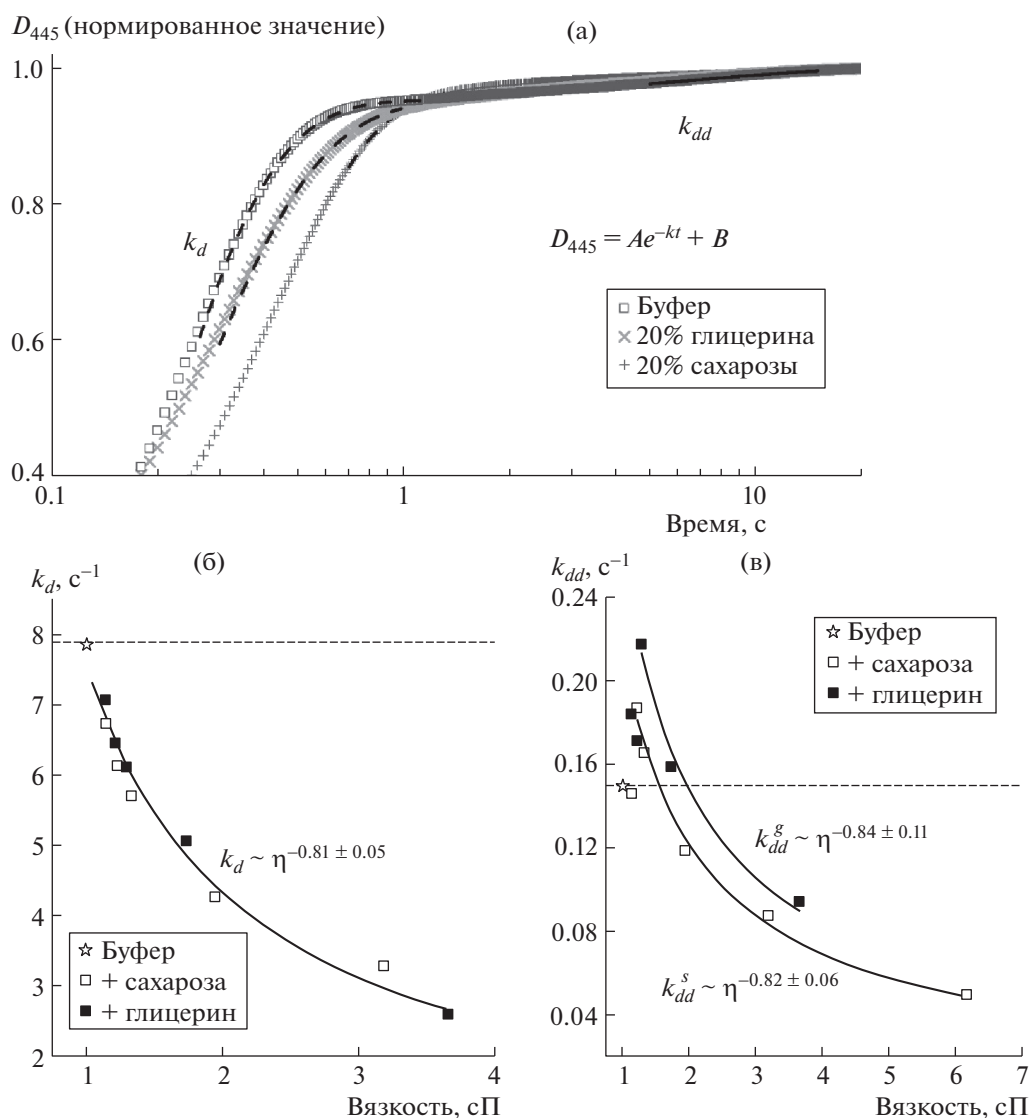
Увеличение поглощения при 445 нм при добавлении буфера, содержащего растворенный O<sub>2</sub>, к смеси FMNH<sub>2</sub> с люциферазой в обескислоро-

женном буфере, является результатом одновременного протекания двух процессов (рис. 2а): (i) окисления свободного FMNH<sub>2</sub> после его столкновения с O<sub>2</sub> ( $k_d$ , рис. 1) [12] и (ii) распада интермедиата II, образовавшегося после реакции кислорода и FMNH<sub>2</sub> в активном центре фермента ( $k_{dd}$ , рис. 1) [7]. Первый процесс протекает значительно быстрее второго и при 20°C заканчивается в течение <3 с, что позволяет без искажений определять  $k_{dd}$  в диапазоне 5–15 с (рис. 2а).

Установлено, что увеличение вязкости раствора приводит к изменению как  $k_d$ , так и  $k_{dd}$  (рис. 2б, в). В то время как скорость автоокисления флавина ( $k_d$ ) снижается монотонно с ростом содержания глицерина и сахарозы в среде,  $k_{dd}$  возрастает при низкой концентрации вязкого агента. Максимальная нестабильность интермедиата наблюдается в средах с вязкостью около 1.3 сП, при этом скорость распада увеличивается на 20 и 47% в присутствии сахарозы и глицерина соответственно. При дальнейшем росте вязкости  $k_{dd}$  снижается аналогично  $k_d$  (рис. 2б, в).

Для анализа механизмов влияния вязкости на ферментативные реакции используют полуфеноменологический подход, основанный на описании зависимости скорости элементарной биохимической стадии от вязкости среды степенной функцией с показателем  $\delta$  [13], который принимает значение от 0 до 1 и характеризует чувствительность реакции к вязкости среды.

На рис. 2в, видно, что зависимость  $k_{dd}$  от вязкости в диапазоне 1.3–6.0 сП описывается степенной функцией с  $\delta = 0.82–0.84$ , что говорит о высокой степени сопряжения активного центра фермента со средой и характеризует реакцию распада интермедиата как процесс, близкий к диффузионно-контролируемому ( $\delta = 1$ ) [12]. Примечательно, что скорость автоокисления FMNH<sub>2</sub>,  $k_d$ , снижается с ростом вязкости также с показателем  $\delta = 0.81 \pm 0.05$  (рис. 2б). Этот химический процесс происходит без участия фермента и зависит от диффузии растворенного O<sub>2</sub> и FMNH<sub>2</sub> в среде. Близость значений  $\delta$  для растворов сахаро-



**Рис. 2.** Кинетика распада 4а-гидропероксифлавина в вязких средах: а – изменение оптической плотности при 445 нм (в полулогарифмических координатах). Штриховой линией показана аппроксимация кинетики реакции автоокисления FMNН<sub>2</sub> (участок 0.3–1.0 с), сплошной линией – реакции распада пероксифлавина (участок 5–15 с) с помощью изображенного уравнения; б и в – зависимость  $k_d$  и  $k_{dd}$  от вязкости среды соответственно. Линии отражают аппроксимацию данных степенной функцией с указанными показателями (индексы  $s$  и  $g$  обозначают сахарозу и глицерин соответственно). Горизонтальная штриховая линия указывает значение константы скорости для буферного раствора (контроль).

зы и глицерина указывает на сходство механизмов действия сред, независимо от химической структуры вязкого агента.

Поскольку одной из причин наблюдаемых эффектов сред может быть изменение конформационной подвижности активного центра люциферазы, в модельных средах была рассчитана среднеквадратичная флуктуация (RMSF) атомов белка в радиусе 6 Å от молекулы FMN согласно кристаллической структуры [9]. Установлены следующие эффекты: (i) снижение подвижности атомов основной цепи  $\alpha$ -субъединицы на участке 74–79 а.о.; (ii) увеличение мобильности боковых

групп полярных аминокислотных остатков, особенно атомов азота  $\alpha$ Arg107 и  $\alpha$ Arg125 и кислорода  $\alpha$ Asp113,  $\alpha$ Ser176 и  $\alpha$ Thr179 (табл. 1). Известно, что первая группа атомов участвует в связывании изоаллоксазинового кольца, а вторая – в основном в фиксации фосфатной группы флавина [9]. В присутствии глицерина и сахарозы, начиная с самых малых концентраций (в нашем случае – 5%), RMSF атомов первой группы уменьшается приблизительно в 2 раза, а второй группы – увеличивается примерно в 1.7 раз (табл. 1).

Такие изменения могут приводить к ослаблению связывания ферментом субстрата (FMNН<sub>2</sub>)

**Таблица 1.** Среднеквадратичная флуктуация (RMSF) атомов активного центра бактериальной люциферазы в средах с различным содержанием глицерина и сахарозы

А.о./Атом	RMSF*, Å								
	Вода	+ Сахароза				+ Глицерин			
		5%	10%	20%	30%	5%	10%	20%	30%
$\alpha$ Ala74/C $_{\alpha}$	0.83	0.41	0.45	0.41	0.35	0.43	0.38	0.39	0.48
$\alpha$ Ala75/C $_{\alpha}$	0.69	0.34	0.37	0.37	0.31	0.48	0.31	0.34	0.52
$\alpha$ Ile76/C $_{\alpha}$	0.55	0.37	0.37	0.39	0.30	0.40	0.35	0.37	0.39
$\alpha$ Asp113/O $_{\delta 2}$	0.61	0.63	1.29	1.08	1.17	1.39	1.14	1.22	1.16
$\alpha$ Ser176/O $_{\gamma}$	0.70	1.24	1.16	1.22	1.29	1.10	0.77	1.22	1.31

\* Погрешность определения, вычисленная на основе трех повторностей, составляет  $\leq 20\%$ .

и/или интермедиата 4а-гидропероксифлавина, что в итоге усиливает темновой распад последнего. На рис. 2в эта тенденция ярко видна при концентрации глицерина или сахарозы  $< 10\%$ . Дальнейший рост концентрации приводит к увеличению вязкости среды, а значит – к затрудненной диффузии продуктов распада 4а-гидропероксифлавина (FMN и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), что сдвигает равновесие реакции диссоциации в сторону исходных веществ (как, например, в работе [14]), то есть стабилизирует интермедиат II.

Полученные результаты говорят о том, что эффект вязких сред на стабильность интермедиата II реакции является результатом двух разнонаправленных процессов: дестабилизации 4а-перокси-флавина за счет взаимодействия аминокислотных остатков белка с молекулами вязкого агента и, напротив, стабилизации этого интермедиата за счет снижения скорости диффузии продуктов его распада.

Наблюдаемый механизм замедления темнового пути биолюминесцентной реакции за счет диффузионных затруднений продуктов распада ключевого интермедиата может быть реализован и во внутриклеточных условиях, поскольку люцифераза работает в окружении других ферментов и вспомогательных белков, закодированных в *lux*-опероне [15]. Таким образом, повышенная микровязкость служит фактором, не только защищающим люциферазу, как и другие белки, от термоинактивации, но, вероятно, и повышающим квантовый выход биолюминесцентной реакции. Также изменение вязкости внутри клетки может быть механизмом (регулятором) переключения реакции со светового пути на темновой, что требует дальнейшего детального исследования.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (гранты № 6.7734.2017 и № 01201351504).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пучков Е.О. // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. 2014. Т. 31. № 1. С. 3–13.
2. Gadda G., Sobrado P. // Biochemistry. 2018. V. 57. № 25. P. 3445–3453.
3. Gulnov D.V., Nemtseva E.V., Kratasyuk V.A. // Polymer Bulletin. 2016. V. 73. № 12. P. 3421–3435.
4. Huijbers M.M.E. et al. // Archives of biochemistry and biophysics. 2014. V. 544. P. 2–17.
5. Thotsaporn K. et al. // Journal of Biological Chemistry. 2011. V. 286. № 32. P. 28170–28180.
6. Немцева Е.В., Кудряшева Н.С. // Успехи химии. 2007. V. 76. № 1. P. 101–112.
7. Abu-Soud H., Mullins L.S., Baldwin T.O., Raushel F.M. // Biochemistry. 1992. V. 31. № 15. P. 3807–3813.
8. Cline T.W., Hastings J.W. // Biochemistry. 1972. V. 11. № 18. P. 3359–3370.
9. Deeva A.A. et al. // Bioinformatics. 2016. V. 32. № 20. P. 3053–3057.
10. Campbell Z.T. et al. // Biochemistry. 2009. V. 48. № 26. P. 6085–6094.
11. Berendsen H.J.C. // Journal of Computational Chemistry. 2005. V. 26. P. 1701–1718.
12. Gibson Q.H., Hastings J.W. // Biochemical Journal. 1962. V. 83. № 2. P. 368.
13. Sashi P., Bhuyan A.K. // Biochemistry. 2015. V. 54. № 29. P. 4453–4461.
14. Simopoulos T.T., Jencks W.P. // Biochemistry. 1994. V. 33. № 34. P. 10375–10380.
15. Bergner T. et al. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. 2015. V. 1854. № 10. P. 1466–1475.

## VISCOUS MEDIA SLOW DOWN THE DECAY OF THE KEY INTERMEDIATE IN BACTERIAL BIOLUMINESCENT REACTION

A. E. Lisitsa<sup>a,#</sup>, L. A. Sukovatyi<sup>a</sup>, V. A. Kratasyuk<sup>a,b</sup>, and E. V. Nemtseva<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Siberian Federal University, 79 Svobodny pr., Krasnoyarsk, 660041 Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Biophysics SB RAS, 50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: Alisitsa@sfu-kras.ru

Presented by Academician of the RAS I.I. Gitel'zon

The effects of media viscosity on the decay rate of the 4a-hydroperoxy flavin intermediate of the bioluminescent reaction has been investigated. It was found that at low concentrations of glycerol or sucrose (viscosity 1.1–1.3 cP) the decay rate rises, whereas a further increase in viscosity till 6.2 cP leads to a decrease in the decay rate following a power function with an exponent of 0.82–0.84. Using molecular dynamics methods, it was revealed that the presence of glycerol and sucrose molecules causes a change in the mobility of the amino acid residues of the active center of luciferase, particularly those responsible for binding of flavin. The results obtained indicate that two counteracting effects of viscous media with glycerol and sucrose occur: 1) destabilization of 4a-hydroperoxy flavin due to a change in structural and dynamic properties of the protein, 2) stabilization of this intermediate by a decrease in the diffusion rate of its decay products.

**Keywords:** bacterial luciferase, bioluminescence, viscous microenvironment, stopped-flow technique, molecular dynamics method, enzyme reaction intermediate, diffusional restriction