



УДК 543.94, 577.151.03

## Спектры флуоресценции ферментов биолюминесцентной реакции бактерий в вязких средах

О. С. Сутормин<sup>1</sup>, И. Е. Суковатая<sup>1</sup>, В. А. Кратасюк<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Сибирский федеральный университет, Красноярск*

<sup>2</sup>*Институт биофизики СО РАН, Красноярск*

*E-mail: ISukovataya@sfu-kras.ru*

**Аннотация.** Исследованы спектры флуоресценции ферментов биферментной биолюминесцентной системы (НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза) в условиях различной вязкости и экстремальной температуры, превышающей оптимум функционирования. Показано, что увеличение вязкости макроокружения ферментов приводит к появлению концентрационного тушения интенсивности флуоресценции. Наибольший вклад в спектр флуоресценции белков в вязких средах вносят их «внутренние» триптофановые остатки. Спектры флуоресценции для люциферазы и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы показали отсутствие заметных конформационных изменений в структуре белков в вязких средах, моделируемых различными концентрациями глицерина и сахарозы, и при экстремальной температуре.

**Ключевые слова:** биферментная система светящихся бактерий НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, биолюминесценция, флуоресценция, глицерин, сахароза, вязкость.

### **Введение**

Уникальным объектом для изучения структурно-динамической организации белковых макромолекул – одной из фундаментальных проблем современной биофизики и биохимии, является биферментная система светящихся бактерий НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, которая способна трансформировать энергию химических связей в световую. Биолюминесценция светящихся бактерий представляет собой два сопряжённых ферментативных процесса, катализируемых НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой и люциферазой [11].

Высокая специфичность и эффективность бактериальной биолюминесценции определяет широкое применение биолюминесценции в виде аналитических методов и биотестов (определение микроколичеств субстратов реакций и активность ферментов, участвующих в метаболизме этих субстратов; определение токсичности химических веществ, как чувствительный метод определения важных для медицины метаболитов и при мониторинге окружающей среды и др.) [9].

Одним из перспективных подходов для получения информации о взаимосвязи структуры и функции белков является «дизайн среды», кото-

рый предполагает направленное изменение физико-химических свойств реакционной среды (вязкость, гидрофобность, диэлектрическая проницаемость, pH, ионная сила и т. д.), в которой функционирует, например, фермент, что позволяет моделировать многие биохимические процессы, например функционирование белка в условиях, близких к естественным (*in vivo*), а также получить информацию о ферментах, зачастую не доступных в рамках традиционной «водной» энзимологии [1; 2]. Например, флуоресценция триптофана, как известно, наиболее чувствительна к полярности микроокружения белковых макромолекул, и широко используется как инструмент для мониторинга конформационных изменений в белках, позволяющий делать выводы относительно их локальной структуры и динамики [4]. Интенсивность и максимальная длина волны ( $\lambda_{\max}$ ) флуоресценции, спектральные сдвиги, анизотропия и другие могут использоваться для характеристики конформационных изменений белка. Для бактериальной люциферазы ранее было показано значительное увеличение интенсивности реакции в водно-органических средах [5], а также изменение сродства к одному из субстратов – длинноцепочечному алифатическому альдегиду [6]. В некоторых водно-органических растворителях различной природы значения максимальной длины волны флуоресценции люциферазы могут сдвигаться до 12 нм в длинноволновую область спектра [7], а в вязких растворителях увеличивается также термостабильность люциферазы и редуктазы [8]. Триптофановые остатки в составе разных бактериальных люцифераз являются консервативными и располагаются в одних и тех же позициях. Так, пять триптофановых остатков *Vibrio harveyi* ( $\alpha$ Trp40,  $\alpha$ Trp182,  $\alpha$ Trp250,  $\beta$ Trp182 и  $\beta$ Trp194) располагаются внутри белковой глобулы и не контактируют с молекулами среды, а два триптофана ( $\alpha$ Trp194 и  $\alpha$ Trp271) могут быть частично экспонированы в растворитель. Согласно анализу трёхмерной структуры оксидоредуктазы, все триптофановые остатки этого фермента экранированы от растворителя. Таким образом, исследование флуоресценции ферментов биоломинесцентной системы: люциферазы и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы, в присутствии растворителей, имитирующих вязкое микроокружение в клетке при экстремальных температурах, позволит получить информацию о типе триптофанов, взаимодействующих с растворителем при повышенной относительно оптимума температуре, а также их местоположении в белках биферментной биоломинесцентной системы.

В связи с вышеизложенным целью данной работы было исследование спектров флуоресценции ферментов биферментной биоломинесцентной системы (НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза) в условиях различной вязкости и температуры, превышающей оптимум.

### ***Материалы и методы***

Для регистрации спектральных характеристик компонентов биоломинесцентной реакции бактерий использовались лиофилизированные препараты высокоочищенных ферментов, произведённые в лаборатории нано-

биотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН [10]: флакон лиофилизованной люциферазы (L) ЕС 1.14.14.3 из рекомбинантного штамма *E.coli* препарата содержит 0,4 мг/мл в концентрации  $1 \cdot 10^{-6}$  М, флакон лиофилизованной НАДН:ФМН-оксидоредуктазы (R) ЕС 1.5.1.29 (*Ph. leiognathi*) в концентрации 0,18 ед. активности.

Спектры флуоресценции ферментов регистрировали с помощью сканирующего спектрометра Aminco-Bowman Series 2 (Thermo Spectronic, США) с шириной щели 2–4 нм в диапазоне длин волн 300–500 нм, длина волны возбуждения 295 нм. Для регистрации спектров флуоресценции ферментов биферментной биолюминесцентной системы лиофилизованные ферменты растворяли в 0,05 М калий фосфатном буфере (pH 6,8), добавляли в измерительную кювету смеси следующего состава: 50 мкл раствора фермента; 2,5 мл глицерина (5, 10, 25, 50 %), или сахарозы (20, 25, 30, 40 %). Рабочие концентрации глицерина и сахарозы выбирали таким образом, чтобы смоделировать одинаковую вязкость реакционной среды разными по природе водно-органическими растворителями. Величину динамической вязкости реакционной среды брали из химического справочника. Каждый образец подвергался термостатированию в течение 5 мин до начала съёмки при температуре 35 °С. Все спектры флуоресценции корректировали в соответствии с чувствительностью ФЭУ к различным длинам волн с помощью встроенной программы. Анализ и обработка полученных результатов проводилась с применением программы Excel из пакета MS Office, а также с помощью управляющей программы люминесцентного спектра Amino Bowman Series 2.

### **Результаты и обсуждение**

Исследование спектров флуоресценции ферментов биферментной биолюминесцентной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза и люцифераза проводили в условиях различной вязкости, которую варьировали введением в реакционную смесь глицерина и сахарозы при температуре 35 °С. При данной температуре активность изучаемых ферментов в буферных растворах значительно понижается. Так, оптимальная для бактериальной люциферазы температура составляет 22–28 °С, при температуре выше 30 °С люцифераза начинает достаточно быстро инактивироваться [12]. Инактивация НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы происходит при температуре 37 °С путём разворачивания фермента и диссоциации ФАДН<sub>2</sub> кофактора. При температурах выше 37 °С экспоненциально начинает расти константа инактивации NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы [3]. Ранее нами было показано, что в вязких средах при добавлении в реакционную смесь 50 % глицерина или 40 % сахарозы температурный оптимум НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы и люциферазы сдвигается на 10 °С в сторону увеличения и становится равен 35 °С [8]. Известно, что интенсивность люминесценции очень чувствительна к различным внутримолекулярным и межмолекулярным взаимодействиям, которые вызывают её снижение. К числу наиболее активных тушителей люминесценции относят молекулы растворителя [4].

Для получения информации о возможных структурных изменениях ферментов биферментной системы при вышеуказанной температуре в вязких средах, которые стабилизируют эти ферменты от термоинактивации, спектры флуоресценции исследовали при температуре 35 °С.

Показано, что при увеличении вязкости реакционной среды после добавления глицерина или сахарозы наблюдается монотонное уменьшение интенсивности флуоресценции оксидоредуктазы, что объясняется концентрационным тушением внешних триптофанов, при этом в глицерине сдвига максимальной длины волны флуоресценции этого фермента не происходит (рис. 1). Более быстрое снижение значения интенсивности флуоресценции в зависимости от концентрации сахарозы по сравнению с глицерином даёт основание утверждать, что сахароза является более сильным тушителем флуоресценции. Таким образом, из полученных результатов можно сделать вывод, что в присутствии глицерина и сахарозы в различных концентрациях при температуре 35 °С не происходит разворачивание белковой глобулы оксидоредуктаз и эти растворители являются протектантами оксидоредуктазы не только от термоинактивации, но и от разворачивания, причём от инактивации фермент в лучшей степени защищает глицерин.

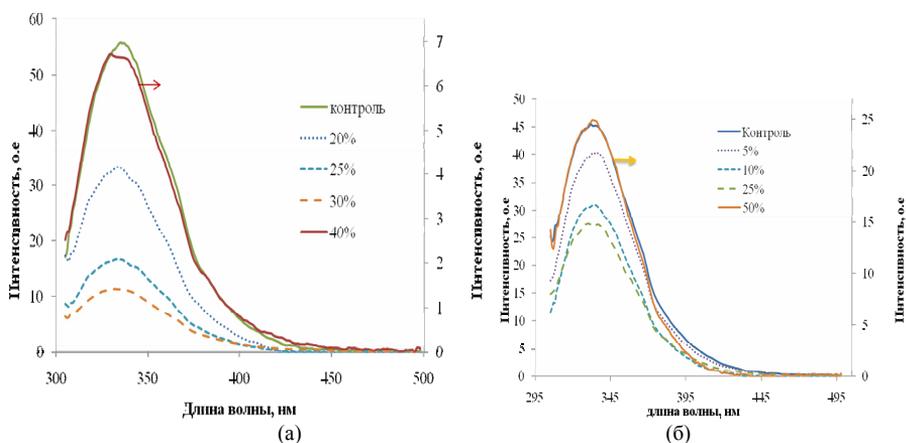


Рис. 1. Спектры флуоресценции *NAD(P)H:FM*-оксидоредуктазы при температуре 35 °С в растворах глицерина (а) и сахарозы (б)

Из спектров флуоресценции оксидоредуктазы при температуре 35 °С в присутствии различных концентраций сахарозы наблюдали гипсохромный сдвиг (около 5 нм) спектров флуоресценции фермента, который может быть вызван уменьшением подвижности близлежащих к триптофановым флуорофорам групп белка [4]. Интенсивность спектров флуоресценции люциферазы при температуре 35 °С (рис. 2) падает с увеличением вязкости реакционной среды как при добавлении сахарозы, так и глицерина, и объясняется концентрационным тушением внешних триптофанов. Как и в случае с оксидоредуктазой, более интенсивное тушение флуоресценции в сахарозе по сравнению с глицерином подтверждает, что сахароза, будучи

более полярным растворителем, является и более сильным тушителем флуоресценции люциферазы.

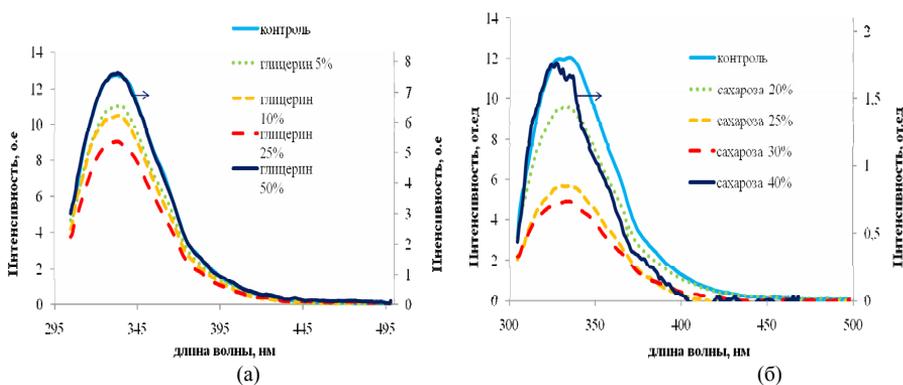


Рис. 2. Спектры флуоресценции люциферазы при температуре 35 °С в присутствии глицерина (а) и сахарозы (б)

В глицерине значения величины  $\lambda_{\text{max}}$  не изменялись, тогда как при добавлении сахарозы был зарегистрирован гипсохромный сдвиг спектров флуоресценции фермента. Гипсохромный сдвиг люциферазы можно объяснить уменьшением эффекта растворителя на триптофановые остатки, экспонированные в среду: согласно структурным особенностям люциферазы это могут быть  $\alpha\text{Trp194}$  и  $\alpha\text{Trp271}$ .

Экспериментально установленное нами положение максимума спектра флуоресценции люциферазы и NAD(P)H:FMN – оксидоредуктазы, равное 330 нм, подтверждает, что наибольший вклад в спектр флуоресценции вносят «внутренние» триптофановые остатки, так как известно, что максимум спектра флуоресценции триптофана в воде наблюдается при 347 нм [4]. Полученные спектры флуоресценции для люциферазы и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы констатируют отсутствие конформационных изменений в третичной и вторичной структуре белков в моделируемых различными концентрациями глицерина и сахарозы вязких средах, что подтверждается отсутствием существенных сдвигов максимумов в спектрах флуоресценции ферментов. Полученные результаты согласуются с результатами других работ о повышенной термостабильности ферментов биолюминесцентной системы в средах с повышенной вязкостью, так как отсутствие существенных изменений в спектрах флуоресценции может свидетельствовать об отсутствии конформационных изменений в глобулах ферментов. Поскольку тушение флуоресценции выбранными растворителями при одном и том же значении вязкости наблюдается в большей степени в сахарозе, можно сделать вывод, что существенную роль в процессе тушения играет природа растворителя, а не только физико-химический параметр – вязкость.

*Работа выполнена при поддержке проекта «Биолюминесцентные биотехнологии» (договор № 11.G34.31.0058), проекта Министерства образования и науки РФ (соглашение 14.A18.21.1911), госконтракта № 1762 Минобрнауки России и Сибирским федеральным университетом.*

#### Список литературы

1. Doukyu N. Organic solvent-tolerant enzymes / N. Doukyu, H. Ogino // *Biochemical engineering J.* – 2010. – N 48. – P. 270–282.
2. Gupta M. N. Enzymes in organic media. Forms, functions and applications / M. N. Gupta, I. Roy // *Eur. J. Biochem.* – 2004. – Vol. 271. – 1–9.
3. Jarrett J. T. Thermal inactivation of reduced ferredoxin (flavodoxin):NADP-oxidoreductase from *Escherichia coli* / J. T. Jarrett, J. T. Wan // *FEBS Lett.* – 2002, N 529. – P. 237–242.
4. Lakowicz J. R. Principles of fluorescence spectroscopy / J. R. Lakowicz. – 3rd ed. – N. Y. : Plenum Press, 2006. – 954 p.
5. Sukovataya I. E. Effect of dielectric properties of media on kinetic parameters of bioluminescent reaction / I. E. Sukovataya, N. A. Tyulkova // *Вестн. МГУ.* – 2000. – Т. 41. – С. 8–11.
6. Sukovataya I. E. Kinetic analysis of bacterial bioluminescence in water-organic media / I. E. Sukovataya, N. A. Tyulkova // *Luminescence.* – 2001. – N 16. – P. 271–273.
7. Sukovataya I. E. Effect of solvents on the fluorescence spectra of bacterial luciferase / I. E. Sukovataya, N. A. Tyulkova // *Progress in Biomedical Optics and Imaging-Proc. SPIE.* – 2006. – Vol. 6163. – P. 11.
8. Sutormin O. S. Thermal stability of coupled enzyme system NADH:FMN-oxidoreductase–luciferase in solvents of different viscosity / O. S. Sutormin, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // *Luminescence.* – 2012. – Vol. 27, N 2. – P. 162.
9. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems / V. A. Kratasyuk [et al.] // *Chemosphere.* – 2001. – N 42. – P. 909–915.
10. Tyulkova N. A. Purification of bacterial luciferase from *Photobacterium leiognathi* with use FPLS-system / N. A. Tyulkova // *Jezowska-Trzebiatowska B., ed. Biological luminescence.* – 1989. – P. 369–374.
11. Tu S. C. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2007. – N 7. – P. 183–188.
12. Tyulkova N. A. Comparative Study of Temperature Effects on Bacterial Luciferases / N. A. Tyulkova, T. P. Sandalova // *Biochemistry.* – 1996. – N 61. – P. 205–214.

## **The Fluorescence Spectra of the Enzymes of Bacterial Bioluminescent Reaction in the Viscous Media**

O. S. Sutormin<sup>1</sup>, I. E. Sukovataya<sup>1</sup>, V. A. Kratasyuk<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Siberian Federal University, Krasnoyarsk*

<sup>2</sup>*Institute of Biophysics, SB RAS, Krasnoyarsk*

**Abstract.** The fluorescence spectra of coupled bioluminescent enzyme system (NAD(P)H:FMN-oxidoreductase and luciferase) in the different viscosity and temperature above the optimum was investigated. It was shown that the increasing in viscosity leads to concentration quenching of the fluorescence intensities. The largest contribution to the fluorescence spectrum includes the «internal» tryptophan residues. The fluorescence spectra obtained for the luciferase and NAD(P)H:FMN-oxidoreductase was showed lack of conformational changes in the structure of proteins in the viscous medium simulated various concentrations of glycerol and sucrose at the extreme temperature.

**Keywords:** the coupled enzyme system of bioluminescence bacteria NAD(P)H:FMN-oxidoreductase-luciferase, bioluminescence, fluorescence, glycerol, sucrose.

*Сутормин Олег Сергеевич*  
аспирант

*Сибирский федеральный университет*  
660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79  
тел.: (391) 206–20–72  
e-mail: ISukovataya@sfu-kras.ru

*Sutormin Oleg Sergeevich*  
Postgraduate

*Siberian Federal University*  
79, Svobodny av., Krasnoyarsk, 660041  
tel.: (391) 206–20–72  
e-mail: ISukovataya@sfu-kras.ru

*Суковатая Ирина Егоровна*  
кандидат биологических наук, доцент  
*Сибирский федеральный университет*  
660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79  
тел.: (391) 206–21–65  
e-mail: ISukovataya@sfu-kras.ru

*Sukovataya Irina Egorovna*  
Candidate of Sciences (Biology)  
Associate Professor  
*Siberian Federal University*  
79, Svobodny av., Krasnoyarsk, 660041  
tel.: (391) 206–21–65  
e-mail: ISukovataya@sfu-kras.ru

*Кратасюк Валентина Александровна*  
доктор биологических наук, профессор  
заведующий кафедрой  
*Сибирский федеральный университет*  
660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79  
*Институт биофизики СО РАН*  
660036, г. Красноярск, Академгородок,  
50/50  
тел.: (391) 206–20–72  
e-mail: ISukovataya@sfu-kras.ru

*Kratasyuk Valentina Aleksandrovna*  
Doctor of Sciences (Biology), Professor  
Head of the Department  
*Siberian Federal University*  
79, Svobodny av., Krasnoyarsk, 660041  
*Institute of Biophysics, SB RAS*  
50/50, Akademgorodok, Krasnoyarsk,  
660036  
tel.: (391) 206–20–72  
e-mail: ISukovataya@sfu-kras.ru