

Анизотропная релаксация возбужденных состояний кофермента FAD, связанного с бактериальной диафоразой

© И.А. Горбунова, Д.В. Яшков, Д.А. Волков, М.Э. Сасин, О.С. Васютинский

ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН,

Санкт-Петербург, Россия

e-mail: i.gorbunova@mail.ioffe.ru

Поступила в редакцию 20.03.2024 г.

В окончательной редакции 28.05.2024 г.

Принята к публикации 29.05.2024 г.

Экспериментально исследована динамика возбужденного состояния кофермента FAD в свободной форме и FAD, связанного с ферментом диафоразы. Исследования проведены посредством регистрации временной зависимости поляризованной флуоресценции методом времякоррелированного счета фотонов после возбуждения молекул FAD фемтосекундными лазерными импульсами. Установлено, что динамика возбужденного состояния комплексов FAD–диафораза существенно отличается от динамики возбужденного состояния свободного FAD в буферном растворе. Показано, что свободный FAD характеризуется четырьмя временами затухания флуоресценции, лежащими в диапазоне от нескольких пикосекунд до нескольких наносекунд, в то время как для комплекса FAD–диафораза наблюдались два времени затухания флуоресценции. При исследовании затухания поляризации флуоресценции комплекса FAD–диафораза обнаружено субнаносекундное время затухания $\tau_{bv} = 130$ ps. Показано, что это время деполяризации флуоресценции обусловлено анизотропной колебательной релаксацией в возбужденном состоянии FAD, которая приводит к вращению дипольного момента перехода FAD вследствие перестройки конфигурации ядер молекулы после возбуждения.

Ключевые слова: FAD, диафораза, поляризованная флуоресценция, TCSPC, анизотропия, время жизни флуоресценции.

DOI: 10.61011/OS.2024.05.58466.6160-24

Введение

Флаavin-аденин-динуклеотид (FAD) является важным естественным коферментом, участвующим в окислительно-восстановительных реакциях, протекающих в живых клетках. В живых клетках FAD может существовать в нескольких формах, среди них наиболее стабильными являются полностью восстановленная ($FADH_2$) и окисленная (FAD^+). Спектральные свойства этих форм значительно отличаются. Окисленная форма FAD^+ обладает широким спектром поглощения в синем и ультрафиолетовом (УФ) спектральных диапазонах с максимумами в районе 450 и 370 nm и флуоресцирует в зеленой области спектра с максимумом на длине волны 532 nm. В свою очередь восстановленная форма $FADH_2$ не флуоресцирует [1]. Эта особенность позволяет использовать FAD^+ в качестве флуоресцентного внутриклеточного зонда для неинвазивной диагностики окислительно-восстановительных реакций в живых клетках. В настоящее время наиболее информативным методом наблюдения флуоресценции FAD в клетках и тканях является микроскопия с визуализацией времен затухания флуоресценции (FLIM) [2], в рамках которой определяются пространственные распределения времен затухания флуоресценции исследуемого флуорофора в клетках и тканях. В частности, анализ времен затухания флуоресценции FAD позволяет различать свободные

и связанные с ферментами формы FAD, сложенные и развернутые конформации FAD, а также отличать сигналы флуоресценции FAD от флуоресценции других внутриклеточных коферментов, например никотинамид-адениндинуклеотида (NAD(P)H) [3,4].

Согласно результатам исследований [1,5–7], свободный FAD в растворах характеризуется одновременно несколькими временами затухания флуоресценции, причем количество этих времен и их значения существенно зависят от экспериментальных условий: pH, концентрации кислорода, полярности и температуры.

Известно, что времена затухания флуоресценции FAD, связанного с ферментами, варьируют в диапазоне от сотен пикосекунд до нескольких наносекунд в зависимости от типа фермента [8,9]. При исследовании FAD, связанного с холестерин оксидазой [6], наблюдались два времени затухания флуоресценции 220 ps и 2.7 ns. Наносекундные времена затухания, лежащие в диапазоне 2.3–2.7 ns, наблюдались также и в других ферментах, например при связывании FAD с оксидазой D-аминокислот [8] и с липоамид-дегидрогеназой (LipDH) [10–12]. При этом также наблюдались и субнаносекундные времена затухания связанного FAD, значения которых существенно зависели от исследуемого фермента и варьировали в широком диапазоне 40–300 ps [8,10]. Эти субнаносекундные времена затухания по-разному интерпретировались различными авторами. В частности, одной из рас-

пространенных гипотез является протекание обратимой реакции переноса электрона в возбужденном состоянии FAD между изоаллоксазином и одной из аминокислот в сайте связывания фермента [8,10,11].

Многоэкспоненциальная динамика затухания флуоресценции свободного и связанного FAD затрудняет интерпретацию времен затухания флуоресценции FAD в живых клетках [13]. Так, при анализе сигналов FLIM в клетках наблюдались два времени затухания флуоресценции FAD порядка 200 ps и 2.5 ns [14], однако основная проблема заключалась в том, чтобы связать эти времена затухания флуоресценции со связанным и свободным состояниями FAD, а также обосновать конкретные механизмы релаксации, которые эти времена обуславливают. В связи с этим существенный интерес представляет получение дополнительной информации о процессах релаксации в возбужденных состояниях молекул посредством исследования затухания анизотропии флуоресценции [15]. Было показано, что анизотропия флуоресценции и время вращательной диффузии существенно отличаются для связанной с ферментами и свободной форм FAD [10,16,17]. В работах [9,13,18] сообщалось об увеличении времени вращательной диффузии на два порядка при связывании FAD с ферментами, что может быть использовано для разделения свободных и связанных состояний FAD в клетках.

Наряду со сравнительно медленными процессами вращательной диффузии наблюдались также и другие процессы со значительно более короткими временами затухания поляризации флуоресценции в комплексах FAD-фермент [9,10,11,16,19,20]. В работе [19] помимо длинного времени вращательной диффузии, составляющего 50–60 ns, наблюдалось более короткое время деполяризации флуоресценции около 0.5 ns, а в работах [9,16] это короткое время составляло около 1.8–7 ns. Однако природа существования этих коротких времен деполяризации до сих пор не установлена и является предметом дискуссий. Одним из возможных объяснений наличия короткого времени деполяризации флуоресценции FAD, связанного с димером фермента LipDH, является резонансный перенос энергии между двумя молекулами FAD, находящимися в двух различных сайтах связывания димера [16]. В качестве другого объяснения было предложено наличие локального вращательного движения FAD в сайте связывания LipDH за счет взаимодействия с аминокислотами [10]. В нашей недавней работе [21] было обнаружено существование короткого (около 1 ns) времени анизотропной релаксации в возбужденном состоянии молекул NADH, связанных с ферментом алкоголь-дегидрогеназа (ADH), которое было объяснено как следствие поворота дипольного момента флуоресценции при перестройке конфигурации ядер молекулы NADH после возбуждения коротким фемтосекундным импульсом. Вместе с тем исследование затухания поляризации флуоресценции комплексов фермент–кофермент в настоящее время еще не получили широкого распространения, а потенциал анализа

соответствующих анизотропных релаксационных процессов реализован слабо.

В настоящей работе впервые были проведены исследования затухания поляризованной флуоресценции FAD, связанного с бактериальной диафоразой при однофотонном возбуждении на длине волны 450 nm. Диафораза — это фермент липоамид-дегидрогеназа, обладающий высокой диафоразной активностью. Этот фермент катализирует окисление NADH до NAD⁺ в присутствии кислорода и играет важную роль в метаболизме и производстве энергии в митохондриях [22,23]. Кроме того, около 50% флуоресценции FAD в митохондриях клетки ассоциируется с FAD, связанным с липоамид-дегидрогеназой [13,24]. Одним из важных результатов данного исследования является наблюдение относительно короткого времени деполяризации флуоресценции τ_{bv} комплекса FAD–диафораза со значением около 130 ps. Анализ времени деполяризации связанного FAD был основан на модели, разработанной недавно в нашей предыдущей публикации [21], в рамках которой короткое время деполяризации комплекса FAD–диафораза характеризует анизотропную колебательную релаксацию в возбужденном состоянии FAD, которая приводит к вращению дипольного момента перехода FAD вследствие перестройки ядерной конфигурации после возбуждения.

Материалы

В качестве FAD-содержащего фермента был использован коммерческий реагент диафораза, выделенная из *Clostridium kluyveri* (Sigma-Aldrich, lot D5540, 5.6 unit/mg, EC 1.8.1.4, CAS 9001-18-7). Диафораза была растворена в буферном растворе PBS (10 mM, pH 7.3) в количестве 1–1.5 mg/ml. Для проведения контрольных экспериментов использовался свободный FAD (чистота 98%, DIA-M), который был растворен в буферном растворе PBS в концентрации 60 μ M. Приготовление растворов осуществлялось непосредственно перед экспериментом при комнатной температуре.

Методика эксперимента

Для регистрации сигналов затухания поляризованной флуоресценции был использован метод, который подробно описан в наших предыдущих публикациях [21,25–27]. Кратко, возбуждение FAD осуществлялось линейно поляризованным лазерным излучением на длине волны 450 nm, что соответствует переходу в первое возбужденное состояние. В качестве источника возбуждения использовалась вторая гармоника фемтосекундного Ti:Sapphire-осциллятора (Mai Tai HP DS, Spectra Physics) с длительностью импульса 100 fs и частотой повторения 80 MHz. Луч лазера фокусировался в центр кварцевой кюветы, содержащей исследуемый молекулярный раствор. Средняя мощность лазерного излучения, сфокусированного на кювете, составляла около 500 μ W. Излу-

чение флуоресценции регистрировалось в направлении, перпендикулярном лучу лазерного возбуждения в спектральном диапазоне 532 ± 10 nm, что соответствовало максимуму спектра флуоресценции FAD. Ортогональные поляризационные компоненты флуоресценции I_{\parallel} и I_{\perp} разделялись призмой Глана и затем одновременно и независимо регистрировались двумя быстродействующими лавинными фотодетекторами (ADP050-СТС, MPD), работавшими в режиме счета фотонов. Ширина функции отклика детекторов составила порядка 50 ps. Формирование сигналов затухания флуоресценции осуществлялось с помощью времякоррелированной системы счета единичных фотонов (TCSPC, PicoHarp 300, PicoQuant). Время накопления сигналов составляло 300 с с частотой дискретизации 4 ps. Чтобы избежать эффекта фотобликинга осуществлялась прокачка раствора через кювету при помощи перистальтического насоса.

Анализ экспериментальных сигналов

При обработке полученных экспериментальных сигналов $I_{\parallel}(t)$ и $I_{\perp}(t)$ поляризованной флуоресценции были использованы следующие выражения [25,28]:

$$I_{\parallel}(t) = G \int_0^t IRF(t') I_{\text{tot}}(t-t') [1 + 2r(t-t')] dt', \quad (1)$$

$$I_{\perp}(t) = G \int_0^t IRF(t') I_{\text{tot}}(t-t') [1 - r(t-t')] dt', \quad (2)$$

где $I_{\text{tot}}(t-t')$ — не зависящая от поляризации компонента интенсивности флуоресценции, описывающая ее изотропное затухание, $r(t-t')$ — зависящая от поляризации компонента интенсивности флуоресценции (анизотропия флуоресценции), описывающая ее анизотропное затухание, $IRF(t)$ — функция отклика детектора, G — коэффициент, учитывающий различие чувствительности двух каналов системы детектирования. Функция отклика детекторов $IRF(t)$ была измерена нами экспериментально путем наблюдения рассеянного излучения второй гармоники фемтосекундного лазера на длине волны 532 nm. Подробная информация об измерении функции отклика детекторов представлена в нашей предыдущей публикации [21].

Изотропные сигналы затухания флуоресценции $I_{\text{tot}}(t)$ определялись на основе выражений (1) и (2) следующим образом [21,29]:

$$I_{\text{tot}}(t) = \frac{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)}{3}. \quad (3)$$

Изотропная составляющая затухания флуоресценции $I_{\text{tot}}(t)$ в выражениях (1), (2) и (3) описывается в общем случае суммой нескольких экспонент:

$$I_{\text{tot}}(t) = I_0 \sum_{i=1}^n a_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right), \quad (4)$$

где I_0 — начальная интенсивность флуоресценции, τ_i — времена затухания флуоресценции, a_i — соответствующие весовые коэффициенты, нормированные на единицу: $\sum_i a_i = 1$.

Анизотропия флуоресценции $r(t)$ в выражениях (1) и (2) определялась из ортогональных поляризационных компонент флуоресценции $I_{\parallel}(t)$ и $I_{\perp}(t)$ [21,29]:

$$r(t) = \frac{\frac{1}{G}I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{\frac{1}{G}I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)}. \quad (5)$$

В общем случае сигнал $r(t)$ не может быть представлен суммой нескольких экспонент. Обычно при наблюдении одной группы флуоресцирующих молекул в растворе затухание анизотропии флуоресценции $r(t)$ (5) может быть удовлетворительно описано одноэкспоненциальной моделью, которая характеризуется временем вращательной диффузии τ_r [29]:

$$r(t) = r_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_r}\right), \quad (6)$$

где r_0 — коэффициент анизотропии. Однако при исследовании молекулярных комплексов затухание анизотропии флуоресценции часто носит более сложный характер [9,10,11,16,19,20].

Для описания наблюдавшихся сигналов затухания поляризации флуоресценции комплекса FAD–диафораза в настоящей работе была использована модель, разработанная в наших недавних работах [21,30], посвященных исследованию процессов анизотропной релаксации кофермента NADH в свободной форме и NADH, связанного с ферментом ADH. В соответствии с этой моделью затухание анизотропии флуоресценции комплекса кофермент–фермент может быть описано выражением

$$r(t) = \left(r_{b1} + r_{b2} e^{-\frac{t}{\tau_{bv}}}\right) e^{-\frac{t}{\tau_{br}}}, \quad (7)$$

где τ_{br} — время вращательной диффузии всего комплекса и τ_{bv} — время анизотропной релаксации возбужденного состояния.

Коэффициенты r_{b1} и r_{b2} в выражении (7) характеризуют угол θ между дипольными моментами переходов возбуждения и флуоресценции в момент возбуждения $t = 0$ и по окончании процессов колебательной релаксации $t = t_{\text{rel}}$, когда возбужденная молекула оказывается в равновесном состоянии:

$$r_{b1} = \langle P_2(\cos \theta) \rangle|_{t=t_{\text{rel}}},$$

$$r_{b2} = \langle P_2(\cos \theta) \rangle|_{t=0} - \langle P_2(\cos \theta) \rangle|_{t=t_{\text{rel}}}. \quad (8)$$

Анализ сигналов затухания ортогональных поляризационных компонент флуоресценции осуществлялся на основе выражений (1) и (2) и моделей (6) или (7) методом глобальной подгонки на основе программы, написанной на языке Python3.

Таблица 1. Времена затухания флуоресценции и весовые коэффициенты для свободных молекул FAD и комплексов FAD–диафороза

| Объект | τ_1 , ns (a_1) | τ_2 , ns (a_2) | τ_3 , ns (a_3) | τ_4 , ns (a_4) |
|---------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Свободный FAD | 0.02 (0.47) | 0.22 (0.11) | 2.26 (0.25) | 3.82 (0.17) |
| FAD–диафороза | 0.23 (0.18) | 4.36 (0.82) | – | – |

Таблица 2. Анизотропия флуоресценции и время деполяризации свободного FAD и комплекса FAD–диафороза

| Объект | r_0, r_{b2} | τ_r, τ_{bv} |
|---------------|---------------|---------------------|
| Свободный FAD | 0.34 | 0.160 ns |
| FAD–диафороза | 0.36 | 0.130 ns |

Результаты

Времена затухания флуоресценции и весовые коэффициенты для свободных молекул FAD в растворе и для комплексов FAD–диафороза, полученные на основе выражений (1)–(4) с помощью метода глобальной подгонки, представлены в табл. 1.

Согласно результатам, представленным в первой строке табл. 1, свободный FAD в буферном растворе характеризовался четырьмя временами затухания флуоресценции: $\tau_1 = 20$ ps, $\tau_2 = 220$ ps, $\tau_3 = 2.26$ ns и $\tau_4 = 3.82$ ns. При этом наибольший вклад в сигнал ($a_1 = 0.46$) вносило самое короткое время затухания $\tau_1 = 20$ ps. Как показано во второй строке табл. 1, при связывании FAD с ферментом диафороза наблюдалось двухэкспоненциальное затухание сигнала флуоресценции с временами $\tau_1 = 230$ ps и $\tau_2 = 4.36$ ns. В этом случае наибольший вклад в сигнал ($a_2 = 0.82$) вносило наносекундное время затухания $\tau_2 = 4.36$ ns, которое сравнимо, но несколько больше, чем самое длинное время затухания свободного FAD $\tau_4 = 3.82$ ns в буферном растворе. Важно отметить, что в комплексе FAD–диафороза отсутствовало самое короткое пикосекундное время затухания 20 ps, которое в свободном FAD в буферном растворе давало наибольший вклад в затухание поляризации флуоресценции.

Результаты анализа деполяризации флуоресценции свободного FAD и комплекса FAD–диафороза представлены в табл. 2. Результаты для свободного FAD в буферном растворе, приведенные в первой строке табл. 2, содержат начальную анизотропию r_0 и время вращательной диффузии τ_r , описывающие наблюдавшееся затухание анизотропии в соответствии с выражением (6). Значения параметров r_0 и τ_r для свободного FAD, приведенные в табл. 2, хорошо согласуются с результатами предыдущих исследований [31].

Результаты, полученные для комплекса FAD–диафороза с использованием выражения (7), приведены во второй строке табл. 2. Как видно, эти результаты, также как результаты для свободного FAD, содержат только два параметра: начальную анизотропию r_{b2} и время затухания анизотропии τ_{bv} , при этом затухание сигнала со временем вращательной диффузии всего комплекса τ_{br} (7), которое в экспериментах с LipDH достигало нескольких десятков наносекунд [9,13,18], в наших экспериментах зарегистрировано не было.

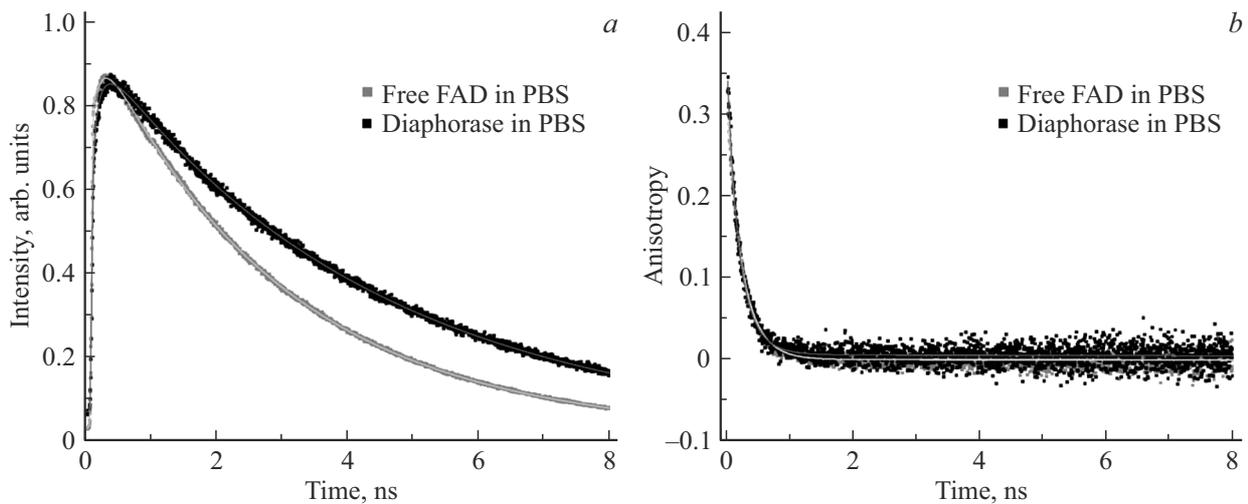
Определенное для этого случая время деполяризации τ_{bv} , приведенное во второй строке табл. 2, оказалось несколько меньше, чем время вращательной диффузии в свободном FAD и составило $\tau_{bv} = 0.130$ ns. Для сравнения на рисунке представлены изотропное $I_{tot}(t)$ и анизотропное $r(t)$ затухание флуоресценции свободного FAD и комплекса FAD–диафороза, полученные на основе экспериментальных сигналов с помощью уравнений (3) и (5) соответственно.

Обсуждение

Полученные экспериментальные результаты продемонстрировали, что затухание флуоресценции свободного FAD в растворе и FAD, связанного с ферментом диафороза, значительно отличаются. Как видно из табл. 1, свободный FAD характеризуется четырьмя временами затухания флуоресценции, лежащими в диапазоне от нескольких пикосекунд до нескольких наносекунд, в то время как в комплексах FAD–диафороза наблюдаются только два времени затухания флуоресценции.

Результаты наших исследований затухания флуоресценции в свободном FAD в растворах, обобщенные в первой строке табл. 1, хорошо согласуются с результатами других авторов. Так, в работах [32,33] наблюдались четыре времени затухания флуоресценции $\tau_1 = 7$ ps ($a_1 = 0.66$), $\tau_2 = 220$ ps ($a_2 = 0.03$), $\tau_3 = 2.09$ ns ($a_3 = 0.17$) и $\tau_4 = 3.97$ ns ($a_4 = 0.14$), где в скобках указаны весовые коэффициенты. Здесь необходимо иметь в виду, что большое значение короткого времени затухания флуоресценции $\tau_1 = 20$ ps, зарегистрированное в настоящей работе, по сравнению с величиной 7 ps, наблюдавшейся в работах [7,32,33], было, вероятно, обусловлено характерным временем отклика детектора, которое составляет 50 ps. Природа этих времен затухания до настоящего времени является предметом дискуссии. Более короткие времена затухания 7 и 220 ps были ассоциированы авторами работ [32,33] с процессами взаимодействия (стэкинга) между аденином и изоаллоксазином в сложной конформации FAD, а времена затухания 2 и 4 ns — с процессами релаксации в развернутых конформациях FAD.

В настоящей работе были впервые проведены исследования затухания флуоресценции в комплексах FAD–диафороза. Полученные результаты, приведенные



(а) Изотропное и (b) анизотропное затухание флуоресценции свободного FAD и комплекса FAD–диафораза. Точки представлены экспериментальные данные, а сплошными линиями — результат аппроксимации. Как экспериментальные данные, так и результат аппроксимации были посчитаны исходя из выражений (3) и (5).

во второй строке табл. 1, свидетельствуют о существовании двух времен затухания: $\tau_1 = 230$ ps и $\tau_2 = 4.36$ ns. В более ранних исследованиях комплексов FAD–LipDH было установлено существование трех времен затухания флуоресценции: $\tau_1 \sim 100$ ps, $\tau_2 = 300 - 700$ ps и $\tau_3 = 2.5 - 3.14$ ns [8,16,19]. Наносекундное время затухания флуоресценции в комплексе FAD–диафораза $\tau_2 = 4.36$ ns, полученное в настоящей работе, было больше, чем время затухания комплекса FAD–LipDH, полученное в ранних исследованиях [8,10,16,20]. Это может быть обусловлено различиями в происхождении ферментов и их активности. В данном исследовании использовалась бактериальная диафораза, в то время как в работах [8,10,16,19] использовался животный фермент LipDH, не обладающий диафоразной активностью. Также в настоящей работе было обнаружено субнаносекундное время затухания флуоресценции FAD–диафораза $\tau_1 = 230$ ps, которое по порядку величины совпадало с результатами ранних исследований FAD, связанного с LipDH [6,8,16].

На основании полученных экспериментальных результатов и их сравнения с результатами других исследователей можно сделать предположение, что наблюдавшееся наносекундное время затухания флуоресценции комплекса FAD–диафораза $\tau_2 = 4.36$ ns обусловлено процессами релаксации в развернутой конформации FAD. Это предположение подтверждается результатами рентгеноструктурного анализа бактериальной диафоразы [11] и животной LipDH [34], согласно которым FAD связывается с этими ферментами в развернутой конформации. Также это предположение находится в согласии с экспериментальными результатами исследований времяз разрешенной флуоресценции свободного FAD в растворах спиртов, где FAD существует только в развернутой конформации [33,35], и исследований

флавинов мононуклеотида (FMN) [7,36], в котором отсутствует взаимодействие между аденином и изоаллоксазином. В этих работах наблюдалось моноэкспоненциальное затухание флуоресценции со временем около 4.0–4.7 ns [7,33,35,36].

Кроме того, как видно из табл. 1, в связанном состоянии FAD отсутствует короткое время затухания флуоресценции порядка 20 ps, которое наблюдается в свободном FAD. В работах [32,33] наличие этого короткого времени затухания ассоциировалось с процессами переноса электрона между аденином и изоаллоксазином в возбужденном состоянии при π -стекинге. Мы полагаем, что отсутствие этого времени в комплексе FAD–диафораза, обусловлено нахождением FAD в сайте связывания фермента в развернутой конформации, в которой π -стекинг не реализуется.

Сравнивая времена затухания флуоресценции свободного FAD $\tau_2 = 220$ ps и комплекса FAD–диафораза $\tau_1 = 230$ ps, представленные в табл. 1, можно заметить, что они совпадают в пределах погрешности эксперимента. Однако, несмотря на такое совпадение, они могут быть обусловлены совершенно разными процессами. Согласно интерпретации авторов работ [32,33], время затухания флуоресценции свободного FAD порядка 200 ps обусловлено взаимодействием аденина и изоаллоксазина в возбужденном состоянии свернутой конформации FAD. В случае связанного FAD время затухания флуоресценции порядка 100–200 ps обусловлено взаимодействием между изоаллоксазином и электрон-донорными аминокислотами в сайте связывания [8,10,11].

Как показано в табл. 2, при исследовании затухания поляризации флуоресценции комплекса FAD–диафораза нами наблюдалось практически одноэкспоненциальное затухание со сравнительно коротким временем затухания около 130 ps, которое было несколько короче,

чем время вращательной диффузии свободного FAD в растворе $\tau_r = 160$ ps. Это короткое время затухания не может быть отнесено к вращательной диффузии комплекса FAD–диафараза, поскольку в соответствии с уравнением Эйнштейна–Стокса [27] время вращательной диффузии комплекса FAD–диафараза вследствие его большой массы и объема должно было быть более 30 ns. Однако подобное наносекундное время затухания для связанного FAD не наблюдалось в условиях нашего эксперимента.

О существовании короткого времени деполяризации в комплексах FAD–LipDH сообщалось в более ранних публикациях [9,10,16,20], где его значение варьировало от 0.5 ns [18,20] до 9 ns [10]. Время деполяризации флуоресценции в комплексе FAD–диафараза, определенное в данном исследовании, меньше, чем короткое время деполяризации флуоресценции комплекса FAD–LipDH, полученное в работах [9,10,16,20].

Интерпретация короткого времени деполяризации флуоресценции молекул FAD, связанных с ферментами, отличается у разных авторов. Одним из объяснений [16] является резонансный перенос энергии между двумя FAD, находящимися в сайтах связывания димера LipDH. Другим объяснением [10] было наличие локального вращательного движения FAD в сайте связывания LipDH за счет движения аминокислот.

В настоящей работе предлагается количественная интерпретация наблюдавшихся экспериментальных результатов на основе выражения (7), основанного на квантово-механической теории [21,30] и описывающего временную зависимость анизотропии флуоресценции молекулярного комплекса. В рамках этой модели короткое время деполяризации флуоресценции комплекса FAD–диафараза $\tau_{bv} = 0.13$ ns характеризует анизотропную колебательную релаксацию в возбужденном состоянии FAD, в процессе которой происходит вращение дипольного момента перехода флуоресценции вследствие перестройки конфигурации ядер молекулы после возбуждения. Мы предполагаем, что локальное вращение всей молекулы FAD в сайте связывания диафаразы не происходит, поскольку FAD образует довольно жесткую структуру нековалентных связей с аминокислотами [37,38].

Согласно этой модели, отсутствие длинного времени вращательной диффузии комплекса FAD–диафараза обусловлено тем, что соответствующий коэффициент анизотропии r_{b1} в (7), (8) был близок к нулю, что свидетельствует о том, что угол между дипольными моментами перехода возбуждения и флуоресценции составлял примерно 58° для связанного состояния FAD.

Отметим, что при исследованиях деполяризации флуоресценции комплексов FAD–LipDH в работах [9,10,16,20] наблюдалось длинное время вращательной диффузии порядка 40–70 ns, при этом коэффициент анизотропии составлял около 0.35 при возбуждении на длине волны 450 nm. Отличие полученного в настоящей работе результата от результатов работ [9,10,16,20]

может быть объяснено тем, что в настоящей работе использовалась бактериальная диафараза, а в работах [9,10,16,20] — не обладавшие диафоразной активностью ферменты животного происхождения, поскольку известно, что структура липоамид-дегидрогеназы и диафаразы может сильно отличаться [39].

Заключение

Проведены исследования времяразрешенной поляризованной флуоресценции комплекса FAD–диафараза и свободного FAD в буферном растворе PBS. Обнаружено, что FAD, связанный с ферментом диафараза, обладает двумя временами затухания флуоресценции $\tau_1 = 0.27$ ns и $\tau_2 = 4.34$ ns, тогда как свободный FAD в растворе характеризуется четырьмя временами затухания флуоресценции: $\tau_1 = 20$ ps, $\tau_2 = 220$ ps, $\tau_3 = 2.3$ ns и $\tau_4 = 3.7$ ns. Показано, что наличие только двух времен затухания комплекса FAD–диафараза было обусловлено тем, что FAD в сайте связывания находится только в одной (развернутой) конформации. Обнаружено, что затухание поляризации флуоресценции комплекса FAD–диафараза характеризуется субнаносекундным временем затухания $\tau_{rb} = 130$ ps, в то время как существенно более длинное время вращательной диффузии вообще не наблюдалось. При интерпретации полученных результатов было предложено, что наблюдавшееся время деполяризации флуоресценции было обусловлено анизотропной колебательной релаксацией в возбужденном состоянии коферментов, которая сопровождалась поворотом дипольного момента перехода за счет перестройки конфигурации ядер в молекуле FAD. Полученный результат может быть использован для анализа взаимодействий FAD с различными ферментами в растворах и живых клетках.

Финансирование работы

И.А. Горбунова, М.Э. Сасин, Д.В. Яшков и Д.А. Волков выражают благодарность РНФ за финансовую поддержку в рамках гранта № 23-22-00230. Авторы выражают благодарность ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН за предоставление оборудования, использованного в экспериментах.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] S.D.M. Islam, T. Susdorf, A. Penzkofer, P. Hegemann. Chem. Phys., **295**, 137–149 (2003). DOI: 10.1016/j.chemphys.2003.08.013
- [2] M.V. Shirmanova, I.N. Druzhkova, M.M. Lukina, V.V. Dudenkova, N.I. Ignatova, L.B. Snopova, V.I. Shcheslavskiy, V.V. Belousov, E.V. Zagaynova. Sci. Rep., **7**, 8911 (2018). DOI: 0.1038/s41598-017-09426-4

- [3] C. Stringari, L. Abdeladim, G. Malkinson, P. Mahou, X. Solinas, I.I. Lamarre, S. Brizion, J.-B. Galey, W. Supatto, R. Legouis, A.-M. Pena, E. Beaurepaire. *Sci. Rep.*, **7**, 3792 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-03359-8
- [4] X. Wang, Y. Xie, M. Huang, L. Yao, Y. Wang, Y. Fei, J. Ma, L. Mi. *IEEE J. Selected Topics in Quant. Electron.*, **25**, 12019 (2019). DOI: 10.1109/JSTQE.2018.2889429
- [5] A.A. Heikal. *Biomark. Med.*, **4** (2), 241–263 (2010). DOI: 10.2217/bmm.10.1
- [6] R. Schmitz, K. Tweed, C. Walsh, A. J. Walsh, M. C. Skala. *J. Biomed. Optics*, **26**, (2021). DOI: 10.1117/1.jbo.26.5.056502
- [7] A. Sengupta, R.V. Khade, P. Hazra. *J. Photochem. Photobiol. A*, **221** (1), 105–112 (2011). DOI: 10.1016/j.jphotochem.2011.04.033
- [8] N. Nakashima, K. Yoshihara, F. Tanaka, K. Yagi. *J. Biol. Chem.*, **255**, 5261–5263 (1980). DOI: 10.1016/s0021-9258(19)70779-0
- [9] P.A.W. van den Berg, A. van Hoek, A.J.W.G. Visser. *J. Biophys.*, **87**, 2577–2586 (2004). DOI: 10.1529/biophysj.104.040030
- [10] E. Nishimoto¹, Y. Aso, T. Koga, S. Yamashita. *J. Biochem.*, **140**, 349–357 (2006). DOI: 10.1093/jb/ mvj156
- [11] T. Fukamichi, E. Nishimoto. *J. Fluoresc.*, **25** (3), 577–583 (2015). DOI: 10.1007/ s10895-015-1537-x
- [12] P.I.H. Bastiaens, A.V. Hoek, W.J.H.V. Berkel, A.D. Kok, A.J.W.G. Visser. *J. Biochem.*, **31**, 7061–7068 (1992). DOI: 10.1021/bi00146a006
- [13] S. Huang, A.A. Heikal, W.W. Webb. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **82** (5), 2811–2825 (2002). DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75621-X
- [14] R. Cao, H.K. Wallrabe, A. Periasamy. *J. Biom. Opt.*, **25**, 1 (2020). DOI: 10.1117/1.jbo.25.1.014510
- [15] Q. Yu, A.A. Heikal. *J. Photochem. Photobiol. B*, **95** (1), 46–57 (2009). DOI: 10.1016/j.jphotochem.2008.12.010
- [16] P.I. Bastiaens, A. van Hoek, J.A. Benen, J.-C. Brochon, A.J. Visser. *J. Biophys.*, **63**, 839–853 (1992). DOI: 10.1016/S0006-3495(92)81659-4
- [17] J.R. Lakowicz, H. Szmanski, K. Nowaczyk, M.L. Johnson. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **89**, 1271–1275 (1992). DOI: 10.1073/pnas.89.4.1271
- [18] P.A.W. van den Berg, K.A. Feenstra, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen, A.J.W.G. *J. Phys. Chem. B*, **106**, 8858–8869 (2002). DOI: 10.1021/jp020356s
- [19] A.J. Visser, A. van Hoek. *Photochem. Photobiol.*, **33**, 35–40 (1981). DOI: 10.1111/j.1751-1097.1981.tb04293.x
- [20] A.J.W.G. Visser, H.-J. Grande, C. Veeger. *Bioph. Chem.*, **12**, 35–49 (1980). DOI: 10.1016/0301-4622(80)80037-8
- [21] I. Gorbunova, M. Sasin, D. Golyshev, A. Semenov, A. Smolin, Y.M. Beltukov, O.S. Vasyutinskii. *J. Phys. Chem. B*, **125** (34), 9692–9707 (2021). DOI: 10.1021/acs.jpcc.1c04226
- [22] A. Ambrus, B. Torocsik, L. Tretter, O. Ozohanic, V. Adam-Vizi. *Human Molecular Genetics*, **20**, 2984–2995 (2011). DOI: 10.1093/hmg/ddr202
- [23] N.E. Babady, Y.P. Pang, O. Elpeleg, G. Isaya. *Proc. Nat. Acad. of Sci.*, **104** (15), 6158–6163 (2007). DOI: 10.1073/pnas.0610618104
- [24] W.S. Kunz, W. Kunz. *Biochim. et Biophys. Acta — General Subjects*, **841** (3), 237–246 (1985). DOI: 10.1016/0304-4165(85)90064-9
- [25] S. Denicke, K.-H. Gericke, A.G. Smolin, P.S. Shternin, O.S. Vasyutinskii. *J. Phys. Chem. A*, **114**, 9681–9692 (2010). DOI: 10.1021/jp101403x
- [26] M.E. Sasin, A.G. Smolin, K.-H. Gericke, E. Tokunaga, O.S. Vasyutinskii. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **20**, 19922–19931 (2018). DOI: 10.1039/c8cp02708k.
- [27] I.A. Gorbunova, M.E. Sasin, J. Rubayo-Soneira, A.G. Smolin, O.S. Vasyutinskii. *J. Phys. Chem. B*, **124**, 10682–10697 (2020). DOI: 10.1021/acs.jpcc.0c07620
- [28] M.E. Sasin, I.A. Gorbunova, N.O. Bezverkhni, Y.M. Beltukov, O.S. Vasyutinskii, J. Rubayo-Soneira. *Tech. Phys. Lett.*, **45**, 672–674 (2019). DOI: 10.1134/s1063785019070101
- [29] J.R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed. (Springer, NY, 2006). DOI: 10.1007/978-0-387-46312-4
- [30] I.A. Gorbunova, M.E. Sasin, Y.M. Beltukov, A.A. Semenov, O.S. Vasyutinskii. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **22**, 18155–18168 (2020). DOI: 10.1039/D0CP02496A
- [31] M.K. Krasnopedtseva, V.P. Belik, I.V. Semenova, A.G. Smolin, A.A. Bogdanov, O.S. Vasyutinskii. *Tech. Phys. Lett.*, **46** (6), 614–616 (2020). DOI: 10.1134/S1063785020060218
- [32] M.S. Islam, M. Honma, T. Nakabayashi, M. Kinjo, N. Ohta. *Int. J. Mol. Sci.*, **14** (1), 1952–1963 (2013). DOI: 10.3390/ijms14011952
- [33] T. Nakabayashi, M.S. Islam, N. Ohta. *J. Phys. Chem. B*, **114** (46), 15254–15260 (2010). DOI: 10.1021/jp1063066
- [34] T. Toyoda, K. Suzuki, T. Sekiguchi, L.J. Reed, A. Takenaka. *J. Biochem.*, **123**, 668–674 (1998). DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021989
- [35] L. Radoszkowicz, D. Huppert, E. Nachliel, M. Gutman. *J. Phys. Chem. A*, **114** (2), 1017–1022 (2010). DOI: 10.1021/jp908766e
- [36] H. Grajek, I. Gryczynski, P. Bojarski, Z. Gryczynski, S. Bharill, L. Kulak. *Chem. Phys. Lett.*, **439**, 151–156 (2007). DOI: 10.1016/j.cplett.2007.03.042
- [37] S. Chakraborty, M. Sakka, T. Kimura, K. Sakka. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72** (4), 982–988 (2008). DOI: 10.1271/bbb.70724
- [38] E. Szabó, A. Ambrus. *Biologia Futura*, **74** (1), 109–118 (2023). DOI: 10.1007/s42977-023-00155-6
- [39] V. Massey, O. Gibson, C. Veeger. *J. Biochem.*, **77**, 341–351 (1960). DOI: 10.1042/bj0770341