20

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 20.03.2023 г.
В окончательной редакции 28.05.2023 г.
Принята к публикации 29.05.2024 г.

Экспериментально исследована динамика возбужденного состояния кофермента FAD в свободный форме и FAD, связанного с ферментом диафораза. Исследования проведены посредством регистрации временной зависимости поляризованной флуоресценции методом времякоррелированного счета фотонов после возбуждения молекул FAD фемтосекундными лазерными импульсами. Было 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

Флавин-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 суб-наносекундные 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 обусловливают. 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 исследования 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 μM. 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, содержавшей исследуемый молекулярный раствор. Средняя мощность лазерного излучения, сфокуси-

рованного на кювете, составляла около $500\,\mu$W. Излучение 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-CTC, 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 s с частотой дискретизации 4 ps. Чтобы избежать эффекта фотобличинга 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]:

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

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

где $I_{tot}(t-t')$ — 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 $I_{tot}(t)$ определялись на основе выражений (1) и (2) следующим образом [21,29]:

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

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

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

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]:

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

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]:

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

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

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

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 $t = t_{rel}$, когда возбужденная молекула оказывается в равновесном состоянии:

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

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

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-диафораза

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-диафораза	0.23 (0.18)	4.36 (0.82)	–	–

Таблица 2. Анизотропия флуоресценции и время деполяризации свободного FAD и комплекса FAD-диафораза

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

Результаты

Времена затухания флуоресценции и весовые коэффициенты для свободных молекул FAD в растворе и для комплексов FAD-диафораза, 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 диафораза 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-диафораза 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-диафораза 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-диафораза 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.

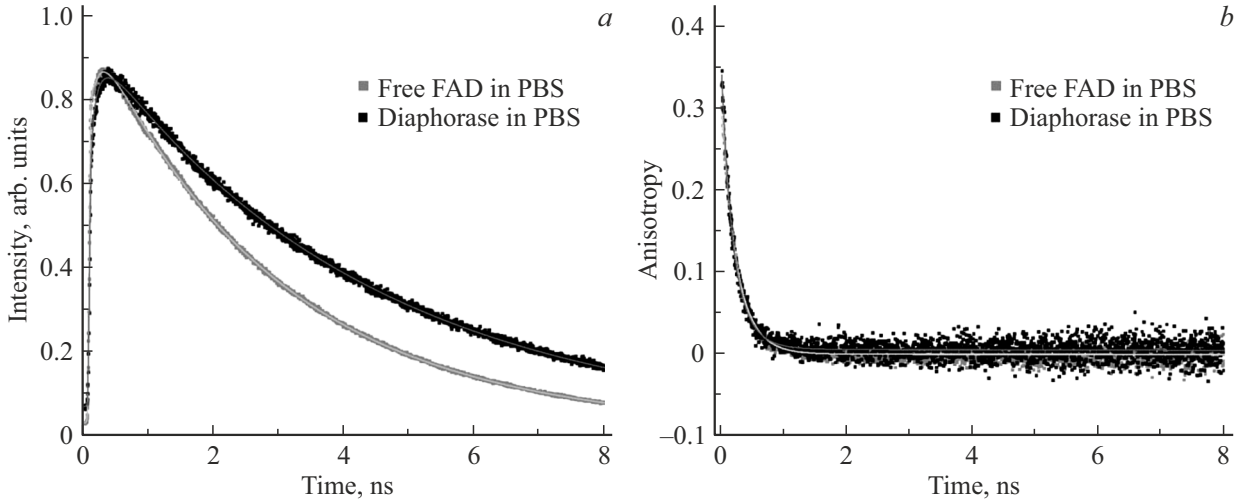
Определенное для этого случая время деполяризации τ_{bv}, приведенное во второй строке табл. 2, оказалось несколько меньше, чем время вращательной диффузии в свободном FAD и составило $\tau_{bv} = 0.130$ ns. Для сравнения на рисунке представлены изотропное $I_{tot}(t)$ и анизотропное $r(t)$ затухание флуоресценции свободного FAD и комплекса FAD-диафораза, 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 диафораза, 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-диафораза 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 сложенной 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-диафораза. Полученные результаты, приведенные во



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

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 времяразрешенной флуоресценции свободного FAD в растворах спиртов, где FAD существует только в развернутой конформации [33,35], и исследований флавин 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-диафораза, поскольку в соответствии с уравнением Эйнштейна-Стокса [27] время вращательной диффузии комплекса FAD-диафораза 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-диафораза, 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, находящихся 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-диафораза $\tau_{bv} = 0.13$ 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 диафоразы не происходит, поскольку FAD образует довольно жесткую структуру нековалентных связей с аминокислотами [37,38].

Согласно этой модели, отсутствие длинного времени вращательной диффузии комплекса FAD-диафораза 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 диафораза, а в работах [9,10,16,20] — не обладавшие диафоразной активностью ферменты животного происхождения, поскольку известно, что структура липоамид-дегидрогеназы и диафоразы может сильно отличаться [39].

Заключение

Проведены исследования времяразрешенной поляризованной флуоресценции комплекса FAD-диафораза и свободного FAD в буферном растворе PBS. Обнаружено, что FAD, связанный с ферментом диафораза, 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-диафораза было обусловлено тем, что FAD в сайте связывании находится только в одной (развернутой) конформации. Обнаружено, что затухание поляризации флуоресценции комплекса FAD-диафораза 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.jphotobiol.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. Szmacinski, 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.jpcb.1c04226
[22] A. Ambrus, B. Torocsik, L. Tretter, O. Ozohanics, 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.jpcb.0c07620
[28] M.E. Sasin, I.A. Gorbunova, N.O. Bezverkhnii, 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. Krasnopevtseva, 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