

БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА,  
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.151.03

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ НАД(Ф)Н : ФМН-ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ  
В УСЛОВИЯХ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА:  
МОДЕЛИРОВАНИЕ IN VITRO

А. Е. Говорун<sup>1,\*</sup>, Е. Н. Есимбекова<sup>1,2</sup>, В. А. Кратасюк<sup>1,2</sup>

Представлено академиком РАН А. Г. Дегерменджи 19.10.2018 г.

Поступило 31.10.2018 г.

Изучено функционирование НАД(Ф)Н : ФМН-оксидоредуктазы (Red) из *Vibrio fischeri* в условиях макромолекулярного краудинга (ММК), смоделированных in vitro добавлением биополимеров крахмала и желатина. Рассчитаны значения констант скорости и энергий активации диссоциации Red на субъединицы, проанализирован процесс денатурации Red. Показано, что функционирование Red в условиях ММК не отличается от такового в разбавленных растворах. Полученный результат опровергает распространённое убеждение в том, что в условиях in vivo благодаря ММК происходит стабилизация нативной конформации ферментов по сравнению с условиями in vitro.

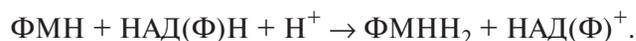
*Ключевые слова:* НАД(Ф)Н : ФМН-оксидоредуктаза, макромолекулярный краудинг, термоинактивация ферментов, крахмал, желатин.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524864500-503>

Полученный к настоящему времени обширный объём знаний о механизмах ферментативного катализа относится в основном к области классической биохимии, изучающей процессы в идеальных разбавленных растворах. При этом не до конца ясной остаётся общая картина функционирования ферментов в естественной внутриклеточной среде, отличающейся характерной “теснотой” вследствие высокого содержания различных макромолекул в единице объёма [1]. Термодинамические последствия, возникающие в условиях малого доступного свободного объёма, называют эффектом исключённого объёма, а в частном случае внутриклеточной среды, когда причиной тому служит большая концентрация макромолекул — эффектом макромолекулярного краудинга [2]. Так, благодаря эффекту макромолекулярного краудинга (ММК) происходит уменьшение энтропии среды, вследствие чего увеличивается количество свободной энергии и термодинамическая активность находящихся в среде макромолекул. Это приводит к изменению термодинамического равновесия таких процессов, как ассоциация и диссоциации макромолекул, связывание

макромолекул с лигандами, сворачивание белка, денатурация белка и других [3]. Ввиду сложности изучения функционирования ферментов непосредственно внутри клетки актуальным является моделирование эффекта ММК in vitro.

На протяжении последних десятилетий весьма активно изучаются механизмы взаимодействия ферментов в сопряжённой биферментной системе светящихся бактерий НАД(Ф)Н : ФМН-оксидоредуктаза+люцифераза [4]. Интерес к данной ферментной системе в первую очередь обусловлен широкими возможностями её практического применения в качестве биоаналитического инструмента [5, 6]. Объектом исследования в нашей работе был выбран фермент НАД(Ф)Н : ФМН-оксидоредуктаза (Red) из *Vibrio fischeri*, являющийся первым звеном данной сопряжённой ферментной системы и катализирующий следующую реакцию:



На сегодня выделяют несколько различных типов Red, способных функционировать совместно с люциферазой в клетке: LuxG, закодированная в lux-опероне [7], Fre [8], а также FRP, FRD [9] и FRase I [10]. При этом в одной бактериальной клетке могут одновременно присутствовать Red сразу нескольких типов. Молекулы всех охаракте-

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

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

\*E-mail: aebezrukih@gmail.com

ризованных Red из светящихся бактерий имеют структуру гомодимеров [11].

Цель данной работы состояла в определении закономерностей функционирования Red из *Vibrio fischeri* в условиях ММК in vitro применительно к процессам диссоциации Red на субъединицы и денатурации её отдельных субъединиц. В качестве добавок для моделирования внутриклеточной среды использовали наиболее подходящие для этой цели биополимеры желатин и крахмал [12].

В результате проведённого исследования не было зафиксировано изменений в протекании процессов диссоциации Red на субъединицы и денатурации её отдельных субъединиц при помещении в условия ММК. Таким образом, было доказано, что не для всех ферментов справедливо утверждение о том, что in vivo и in vitro ферментативные процессы протекают по-разному.

Исследованный препарат Red был произведён в лаборатории нанобиотехнологии и бактериальной биолюминесценции ИБФ СО РАН (Красноярск). Активность Red определяли спектрофотометрическим методом по скорости расходования НАД(Ф)Н:

$$v = \frac{\Delta A}{\epsilon \Delta t},$$

где  $A$  — оптическая плотность раствора,  $\epsilon$  — коэффициент экстинкции НАД(Ф)Н на длине волны  $\lambda = 340$  нм,  $t$  — время.

Были получены кинетические кривые термоинактивации Red при 25, 30, 35, 40 °С в 0,05 М калий-фосфатном буферном растворе (рН 6,8) без добавок, а также в 2%-м растворе крахмала и 1%-м растворе желатина, приготовленных на основе буферного раствора. На рис. 1 в качестве примера приведены кинетические зависимости термоинактивации Red в буферном растворе без добавок. Все полученные кинетические зависимости в координатах уравнения первого порядка имеют вид кривых с “изломом”, что характерно для диссоциативного механизма термоинактивации ферментов [13]. В таком случае начальные отрезки кинетических кривых соответствуют процессу диссоциации ферментов на субъединицы, а вторые линейные участки — процессу денатурации.

При сравнении вторых линейных участков полученных кинетических зависимостей (рис. 1) с аналогичными участками классических зависимостей, описывающих инактивацию олигомерных ферментов по диссоциативному механизму [13], нельзя наблюдать полное соответствие. В нашем случае,

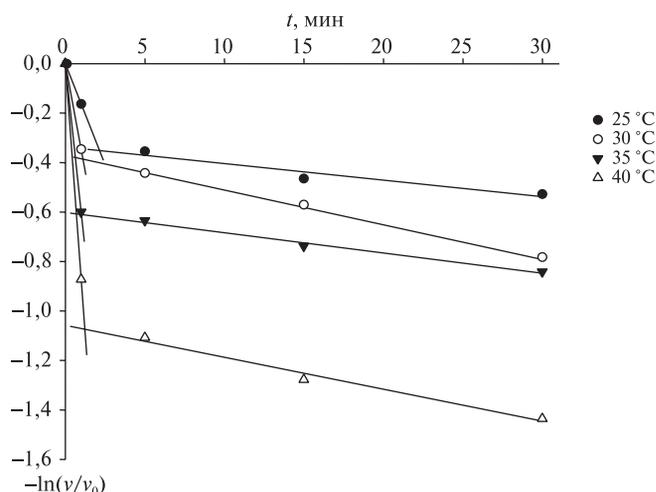


Рис. 1. Кинетические зависимости термоинактивации Red в 0,05 М калий-фосфатном буфере (рН 6,8) при 25, 30, 35, 40 °С.

в отличие от классического, не происходит последовательное увеличение тангенса угла наклона вторых линейных участков кривых с ростом температуры. Тем не менее процессом, происходящим на втором этапе инактивации, наверняка является денатурация ферментов. Скорее всего такой внешний вид кинетических кривых лишь подтверждает тот факт, что исследуемый ферментный препарат в своем составе содержит несколько разных типов Red, молекулы которых имеют разную структуру. При этом влияния эффекта ММК на процесс денатурации Red не было выявлено.

Были рассчитаны константы  $k_1$  скорости диссоциации Red в окружении добавок, моделирующих ММК, и без них в исследованном диапазоне температур, исходя из соотношения [14]

$$k_1 t = 1,5 - 2 \frac{v}{v_0} + 0,5 \left( \frac{v}{v_0} \right)^2,$$

где  $v_0$  — активность Red (скорость реакции) в начальный момент времени,  $v$  — активность Red в момент времени  $t$ , меньшего времени достижения точки “излома”.

Погрешность для  $k_1$  определяли как среднеквадратичную ошибку среднего функции нескольких независимых переменных. После алгебраических преобразований формула для расчёта погрешности имеет вид

$$\sigma(k_1) = \frac{1}{tv_0^2} \left[ (v - 2v_0)^2 \sigma^2(v) + \left( 2v - \frac{v^2}{v_0} \right)^2 \sigma^2(v_0) \right]^{1/2}.$$

В табл. 1 приведены константы скорости диссоциации Red в окружении крахмала, в окружении желатина и без добавок с указанием погрешностей. Достоверные различия по сравнению со значениями констант в отсутствие добавок были зафиксированы только в присутствии желатина при 35 и 40 °С.

С целью уточнения полученных результатов были определены энергии активации процесса диссоциации. Для этого были построены зависимости констант скорости диссоциации от температуры в координатах уравнения Аррениуса (рис. 2) и определены тангенсы углов наклона прямых, аппроксимирующих экспериментальные точки. В итоге энергия активации процесса диссоциации Red в отсутствие добавок составила  $(79 \pm 9)$  кДж/моль, в присутствии крахмала  $(79 \pm 8)$  кДж/моль, в присутствии желатина  $(83 \pm 12)$  кДж/моль, откуда следует, что эффект ММК, создаваемый как макромолекулами крахмала, так и желатина, в целом не влияет на величину энергетического барьера для диссоциации Red на субъединицы и, следовательно, не изменяет состояние равновесия нативный фермент — отдельные субъединицы фермента.

Таким образом, в настоящей работе не было выявлено каких-либо особенностей функционирования Red при помещении в условия ММК, моделируемые путём добавления крахмала и желатина. А именно, не было зафиксировано изменений в протекании таких характерных процессов, как диссоциация Red на субъединицы и денатурация отдельных субъединиц. Данный результат доказывает, что отнюдь не для всех ферментов справедливо утверждение о том, что *in vivo* процессы протекают особым образом, отличным от наблюдаемого *in vitro*. И, следовательно, знания, получаемые при изучении ферментов *in vitro* общепринятыми методами в разбавленных растворах, могут быть экстраполированы на условия *in vivo*.

Кроме того, достигнутые результаты имеют практическое значение. Изученные биополимеры (крахмал и желатин) обладают способностью к форми-

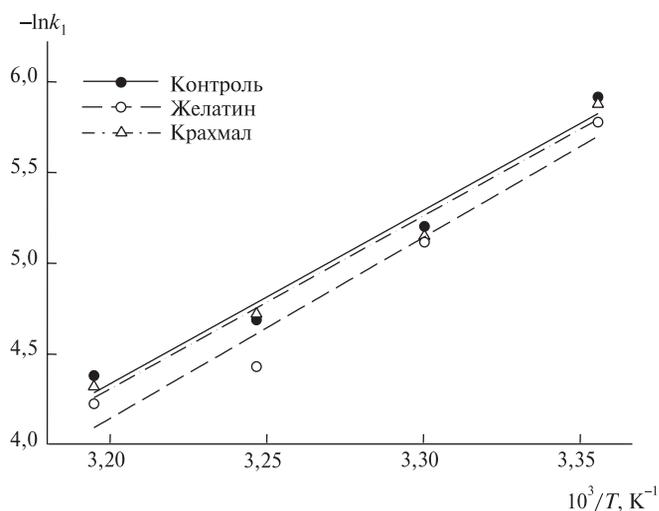


Рис. 2. Зависимости констант скорости диссоциации Red в буферном растворе без добавок (контроль) и с добавлением крахмала и желатина от температуры в координатах уравнения Аррениуса.

рованию гелей, поэтому их можно использовать в качестве матрицы-носителя для иммобилизации ферментов. И если рассматривать настоящую работу с прикладной точки зрения, можно заключить, что в ходе процедуры иммобилизации Red в гели крахмала или желатина на стадии включения в жидкие растворы полимеров не будет происходить потеря активности ферментов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки в рамках научных проектов № 18–44–243010 “Стабилизация биферментной системы светящихся бактерий NADH : FMN-оксидоредуктаза+люцифераза путём помещения в гели и вязкие растворы биополимеров с целью усовершенствования реагента, используемого для оценки уровня загрязнения окружающей среды” и № 18–44–242003 “Конструирование ферментативного реагента для биолюминесцентного анализа: механизмы увеличения чувствительности и точности”.

Таблица 1. Константы скорости диссоциации Red в буферном растворе без добавок (контроль) и с добавлением крахмала и желатина при разных температурах ( $M \pm m$ ,  $n = 3$ )

| T, °C | $k_1 \cdot 10^3, \text{c}^{-1}$ |                |                  |
|-------|---------------------------------|----------------|------------------|
|       | Контроль                        | 2%-ный крахмал | 1%-ный желатин   |
| 25    | $2,7 \pm 1,3$                   | $2,8 \pm 1,3$  | $3,1 \pm 1,0$    |
| 30    | $5,5 \pm 1,1$                   | $5,8 \pm 0,9$  | $6,4 \pm 1,9$    |
| 35    | $9,2 \pm 0,9$                   | $8,9 \pm 0,9$  | $11,9^* \pm 1,2$ |
| 40    | $12,5 \pm 0,5$                  | $13,3 \pm 0,9$ | $14,6^* \pm 0,9$ |

\*  $p < 0,05$  по сравнению с контрольными значениями при соответствующей температуре.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Luby-Phelps K.* // *Int. Rev. Cytol.* 1999. V. 192. P. 189–221.
2. *Minton A.P.* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 14. P. 10 577–10 580.
3. *Zhou H.X.* // *Ann. Rev. Biophys.* 2008. V. 37. P. 375–397.
4. *Hastings J.W., Potrikus C.J., Gupta S.C., Kurfurst M., Makemson J.C.* // *Adv. Microbial Physiol.* 1985. V. 26. P. 235–291.
5. *Esimbekova E., Kratasyuk V., Shimomura O.* // *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 2014. V. 144. P. 67–109.
6. *Kratasyuk V.A., Esimbekova E.N.* // *Combin. Chem. & High Throughput Screening.* 2015. V. 18. № 10. P. 952–959.
7. *Lin J.W., Chao Y.F., Weng S.F.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 246. № 2. P. 446–452.
8. *Zenno S., Saigo K.* // *J. Bacteriol.* 1994. V. 176. № 12. P. 3544–3551.
9. *Tu S.C.* // *Photochem. & Photobiol. Sci.* 2008. V. 7. № 2. P. 183–188.
10. *Zenno S., Saigo K., Kanoh H., Inouye S.* // *J. Bacteriol.* 1994. V. 176. № 12. P. 3536–3543.
11. *Koike H., Sasaki H., Kobori T., Zenno S., Saigo K., Murphy M.E., Adman E.T., Tanokura M.* // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 280. № 2. P. 259–273.
12. *Ling G.N.* // *Life at the Cell and Below-Cell Level: The Hidden History of a Fundamental Revolution in Biology.* N.Y.: Pacific Press, 2001. 400 p.
13. *Полторац О.М., Чухрай Е.С.* // *Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология.* 1986. Т. 5. С. 50–86.
14. *Полторац О.М., Чухрай Е.С., Торшин И.Ю.* // *Биохимия.* 1998. Т. 63. № 3. С. 360–369.

## NAD(P)H : FMN-OXIDOREDUCTASE FUNCTIONING UNDER MACROMOLECULAR CROWDING: *IN VITRO* MODELING

A. E. Govorun<sup>1</sup>, E. N. Esimbekova<sup>1,2</sup>, V. A. Kratasyuk<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>*Institute of Biophysics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Krasnoyarsk, Russian Federation*

Presented by Academician of the RAS A.G. Degermendzhy October 19, 2018

Received October 31, 2018

The functioning of *Vibrio fischeri* NAD(P)H : FMN-oxidoreductase (Red) under conditions of macromolecular crowding (MMC) modeled *in vitro* by adding biopolymers (starch and gelatin) was studied. The dissociation rate constants and the activation energies of dissociation of Red to the subunits were calculated; the process of denaturation of Red was analyzed. It was shown that the functioning of Red both under conditions of MMC and diluted solutions is the same. The result refutes the common belief that due to MMC the stabilization of enzymes' native conformation occurs *in vivo* when compared to *in vitro*.

**Keywords:** NAD(P)H : FMN-oxidoreductase, macromolecular crowding, thermal inactivation of enzymes, starch, gelatin.