

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ В.А. Кратасюк

« ____ » _____ 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 – Физика

**Моделирование нестационарной кинетики биолюминесцентной
реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в присутствии
краудинг-агента фикола**

Руководитель _____

Лисица А.Е.

Выпускник _____

Прокопишко Ю.В.

Научный консультант _____

канд. физ.-мат. наук Немцева Е.В.

Красноярск 2018

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Моделирование нестационарной кинетики биолюминесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в присутствии краудинг-агента фиколла» содержит 39 страниц текстового документа, 17 иллюстраций, 5 таблиц, 21 использованный источник.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ РЕАКЦИЯ, НЕСТАЦИОНАРНАЯ КИНЕТИКА, МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КРАУДИНГ, ВЯЗКОСТЬ, ФИКОЛЛ, ЛЮЦИФЕРАЗА, САХАРОЗА.

Объект исследования – реакция, катализируемая бактериальной люциферазой.

Цель исследования – проанализировать эффект молекулярного краудинга на многостадийный биохимический процесс на примере биолюминесцентной реакции бактерий.

Задачи: 1) зарегистрировать нестационарную кинетику реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в присутствии макромолекулярного краудинг-агента и низкомолекулярного вязкого косольвента; 2) методами численного моделирования кинетических кривых получить константы скоростей отдельных стадий реакции в вязкой среде и условиях макромолекулярного краудинга; 3) проанализировать влияние условий макромолекулярного краудинга и повышенной вязкости на кинетику биолюминесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой.

Установлено, что добавление вязкого косольвента и краудинг-агента воздействуют на кинетику биолюминесцентной реакции схожим образом. Это может говорить о незначительном влиянии исключенного объема на реакцию, катализируемую бактериальной люциферазой и ключевой роли вязкости в наблюдаемых эффектах.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 Обзор литературы.....	6
1.1 Реакция, катализируемая бактериальной люциферазой.	6
1.2 Молекулярный краудинг	10
1.2.1 Влияние молекулярного краудинга на ферментативные реакции....	11
1.3 Влияние вязких сред на ферментативные реакции	13
1.4 Экспериментальные методы регистрации нестационарной кинетики ...	14
1.4.1 Основные принципы регистрации нестационарной кинетики	14
1.4.2 Изучение билюминесцентных реакций с помощью метода остановленной струи.....	18
1.4.3 Кинетика автоокисления восстановленного флавинмононуклеотида кислородом	21
2 Материалы и методы.....	23
2.1 Реактивы и оборудование	23
2.2 Методика эксперимента.....	24
3 Результаты и обсуждение	27
3.1 Кинетика реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в вязких средах.....	27
3.2 Численное моделирование.....	31
ВЫВОДЫ.....	34
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	36
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	37

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что внутриклеточное пространство представляет собой плотную среду с небольшим количеством свободной воды. Такие условия называются «исключением объема» или «переполнением», «краудингом». Для моделирования такой среды в лабораторных условиях используют краудинг-агенты – инертные полимеры, создающие в растворе условия «переполнения». Современные исследования подтверждают явления, вызванные эффектом краудинга, такие как изменения гидродинамического объема белков, что приводит к сдвигу химического равновесия, а также изменение скорости реакций ассоциации макромолекул.

Но вопрос механизма влияния макромолекулярного краудинга на скорости биохимических процессов по-прежнему остаётся открытым и мало изученным. Такие факторы как повышенная вязкость, изменение конформационной динамики фермента или фермент-субстратных взаимодействий и другие могут оказывать влияние на метаболические процессы в условиях «исключенного объема».

Для понимания принципов функционирования ферментативных цепочек внутри клетки в качестве модельных объектов могут быть рассмотрены биолюминесцентные реакции, о работе которых легко судить по интенсивности свечения.

Целью данной работой было проанализировать эффект молекулярного краудинга на многостадийный биохимический процесс на примере биолюминесцентной реакции бактерий.

Для выполнения цели были поставлены следующие задачи:

- зарегистрировать нестационарную кинетику реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в присутствии макромолекулярного краудинг-агента и низкомолекулярного вязкого косольвента;

- методами численного моделирования кинетических кривых получить константы скоростей отдельных стадий реакции в вязкой среде и условиях макромолекулярного краудинга;
- проанализировать влияние условий макромолекулярного краудинга и повышенной вязкости на кинетику билюминесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой.

1 Обзор литературы

1.1 Реакция, катализируемая бактериальной люциферазой

Бактериальная люцифераза представляет собой флавин-зависимую монооксигеназу, уникальной функциональной особенностью которой является катализ билюминесцентной реакции в светящихся бактериях. Данный фермент является гетеродимером, состоящим из двух разных полипептидов, α - и β -субъединиц (рис.1). Молекулярная масса люцифераз разных видов бактерий варьирует в пределах 77-80 кДа [1].

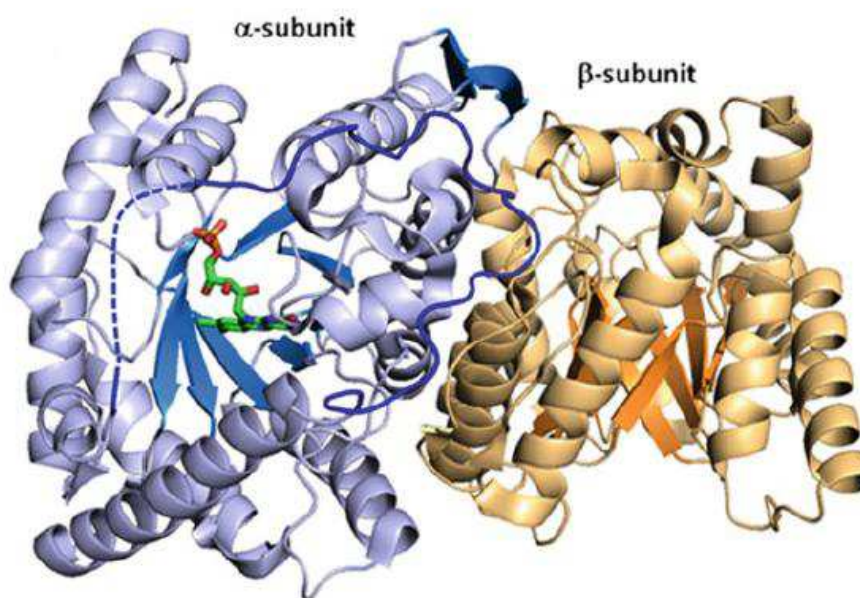


Рисунок 1 – Структура бактериальной люциферазы [1].

Химическая реакция, которая является основой свечения бактерий, является окисление восстановленного флавинмононуклеотида (FMNH_2 ; рис. 2 (A)), длинноцепочечного альдегида (RCHO) и молекулярного кислорода (O_2), до флавина (FMN ; рис. 2 (B)), карбоновой кислоты (RCOOH) и воды (H_2O) с сопутствующим испусканием света ($h\nu$):

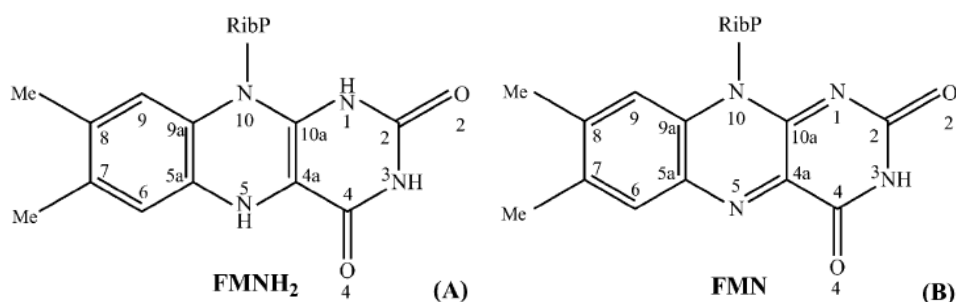
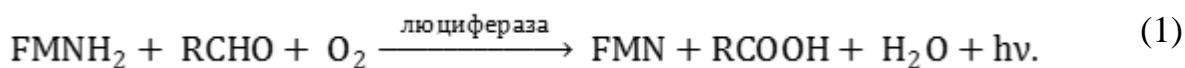


Рисунок 2 – Молекулярная структура FMNH₂ и FMN

Некоторые светящиеся бактерии несут флуоресцентные белки для модуляции цвета излучения. Так, в *Photobacterium leiognathi* взаимодействие люмазина с соответствующими люциферазами дает излучения, сдвинутое гипсохромо на 15 нм. Люциферазы хорошо функционируют с длинноцепочечными альдегидами из восьми атомов углерода или более, причем тетрадеканаль считается природным альдегидом, используемым *in vivo* в люминесцентных бактериях [2]. Но данный реагент подвергается медленному неферментативному окислению, и скорость данной реакции зависит от начальной концентрации и температуры. Люминесцентная реакция, активированная введением раствора FMNH₂, может длиться от 10 до 100 секунд в зависимости от длины цепи используемого альдегида и вида бактерий, из которых выделена люцифераза [3].

Биолюминесцентная реакция бактерий – многостадийный процесс (рис. 3), который включает в себя:

- связывание люциферазы с флавином;
- реакцию фермент-субстратного комплекса с молекулярным кислородом (образование C_{4a}-пероксифлавина);
- связывание альдегида C_{4a}-пероксифлавином с образованием аддукта – флавин-C_{4a}-пероксиполуацеталь;
- диссоциация аддукта на карбоновую кислоту и возбужденный эмиттер (C_{4a}-гидроксифлавин);

- испускание S_{4a} -гидроксифлавином кванта света (с энергией около 490 нм);
- распад S_{4a} -гидроксифлавина на воду и окисленный флавин.

В отсутствие альдегида S_{4a} -пероксифлавин распадается на пероксид водорода и FMN без излучения света через темновой путь.

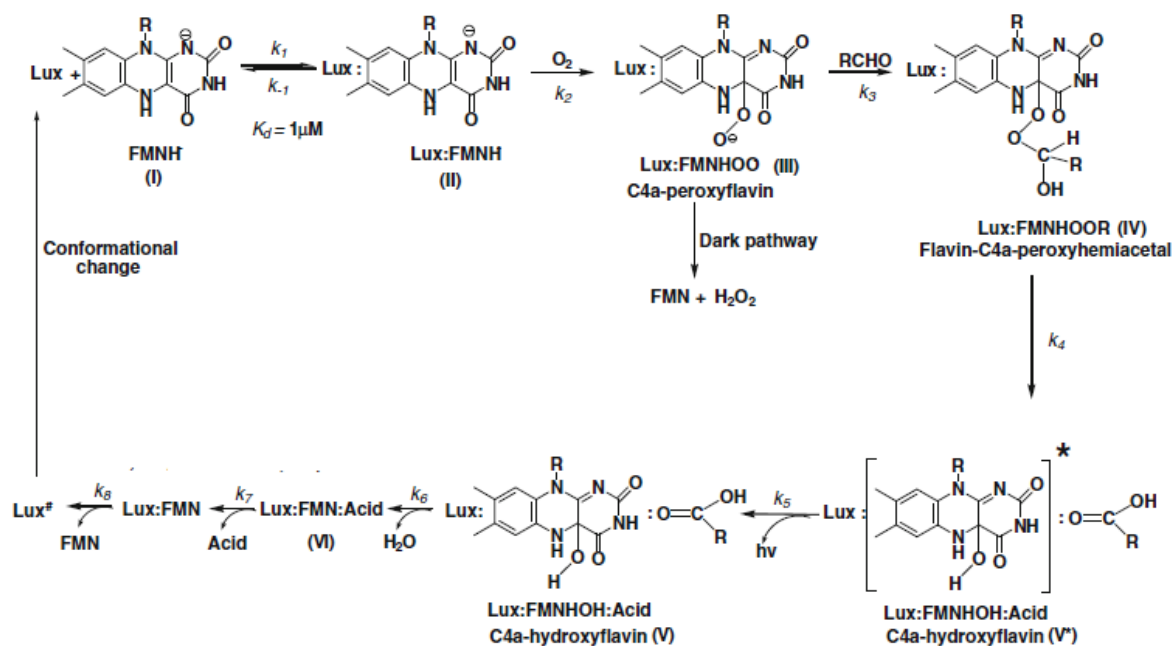
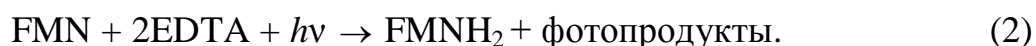


Рисунок 3 – Схема реакции, катализируемой бактериальной люциферазой [1]

Ни один из исходных субстратов бактериальной биолуминесцентной реакции не может существовать в бактериальной клетке в свободном виде (FMNH_2 – по причине быстрого автоокисления, альдегид, потому что является ядом и не производится организмами). Поэтому бактерии имеют специальные ферментативные системы, способствующие восстановлению флавина и карбоновой кислоты для дальнейшего использования в биолуминесценции. Считается, что восстановление FMN в бактериях происходит в реакции, катализируемой другим ферментом – NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой. В экспериментальных исследованиях применяют несколько способов получения FMNH_2 , один из них описан ниже.

Фотовосстановление флавина с этилендиаминтетрауксусной кислотой

Фотовосстановление FMN с этилендиаминтетрауксусной кислоты (далее EDTA) описывается реакцией [4]:



Считается, что EDTA предоставляет 2 необходимых атома водорода. Подробный механизм реакции описан в статьях [5-8]. В ходе необратимой реакции EDTA гидролизуется до гликоксилата с высвобождением CO₂ (обозначено как фотопродукты).

В присутствии EDTA после выключения света не наблюдается окисления FMNH₂ до FMN. Барботирование воздухом (3 см³ в течение 30 с) после 20 минут экспозиции без света также не приводит к окислению. Считается, что кислород, поступающий в процессе барботирования, поглощается фотопродуктами, формируемыми при взаимодействии FMN и EDTA [4].

Было установлено, что в присутствии EDTA при аэробных условиях в течение первых 30 секунд фотовосстановление незначительное. Вероятно, первоначально значителен вклад автоокисления, пока кислород не израсходуется. После выключения света поглощение восстанавливается, сначала медленно, с последующим ускорением. За 40 минут FMN восстанавливается практически полностью. Окисление, скорее всего, вызвано диффузией кислорода. Медленное начало окисления, вероятно, вызвано поглощением кислорода фотопродуктами EDTA [4].

1.2 Молекулярный краудинг

Биохимические процессы, протекающие в клетке, происходят в плотной среде, содержащей нуклеиновые кислоты, белки, низкомолекулярные соединения и полисахариды. Занятый этими компонентами объем может достигать 40% объема всей клетки. Таким образом, белки сворачиваются и функционируют внутри клетки в среде, содержащей большое количество различных биологических макромолекул. Большинство этих биологических макромолекул хотя и не взаимодействует непосредственно с исследуемым белком, но занимает значительную часть свободного пространства клетки. Подобные внутриклеточные условия называют «молекулярным краудингом». Краудинг предполагает присутствие неспецифического стерического отталкивания молекул, которое присутствует независимо от других взаимодействий макромолекул, к примеру, электростатических или гидрофобных [9]. Основным механизмом, по которому молекулярный краудинг воздействует на белок – это минимизация исключенного объема, обусловленного взаимной непроницаемостью всех молекул растворенных веществ [10].

Эффект исключенного объема оказывает значительное влияние на конформационную стабильность и структурные свойства биологических макромолекул. Также макромолекулярный краудинг может влиять на скорости и положение равновесия биохимических реакций, а значит и на процессы сворачивания белка, связывания с малыми молекулами, ферментативную активность, белок-белковые взаимодействия, патологическую агрегацию белков, степень формирования амилоидных фибрилл, обратимую денатурацию белка, полимеризацию актина и др. [10].

На данный момент влияние макромолекулярного краудинга широко изучается. Для моделирования условий макромолекулярного краудинга *in vitro* в раствор добавляют краудинг-агенты. Так как в некоторых системах

большой проблемой может быть взаимодействие белка с краундинг-агентом, то он должен отвечать определённым условиям: молекулы должны иметь форму глобул, раствор не должен быть слишком вязким и не должен проявлять способности к специфическим взаимодействиям с исследуемыми макромолекулами. Также, поскольку понятие краундинга подразумевает наличие лишь стерического отталкивания между отдельными макромолекулами, молекулярная масса должна колебаться в пределах от 50 до 200 кДа. Это значит, что следует соблюдать особую осторожность при проведении экспериментов по моделированию эффекта краундинга и интерпретации их результатов, и, прежде всего, должно быть доказано отсутствие серьезных взаимодействий между белком и краундинг-агентом [11].

1.2.1 Влияние молекулярного краундинга на ферментативные реакции

В настоящий момент, практически все имеющиеся представления о структуре и фолдинге белков сформировались в результате их исследования *in vitro* в разбавленных буферных растворах. *In vivo* белки функционируют в густонаселенной среде в клетке, содержащей большое количество различных биологических макромолекул (глобулярных белков, комплексов внутренне неупорядоченных белков со своими партнерами, нуклеиновых кислот, полисахаридов, рибонуклеопротеинов). Ранее было показано, что для ключевых ферментов гликогенолиза молекулярный краундинг служит фактором, оказывающим существенное влияние на взаимодействия типа белок-лиганд, белок-белок, конформационные переходы и образование надмолекулярных структур и, как следствие, на механизмы функционирования ферментов *in vivo*. Обнаружено влияние краундинга на ассоциацию PhK (киназы фосфорилазы) и Phb (гликогенфосфорилазы). Показано, что краундинг стимулирует ассоциацию PhK в присутствии Ca^{2+} и

Mg^{2+} с образованием надмолекулярных структур, включающих сотни молекул фермента [10]. Также доказано, что для большинства ферментов краудинг может оказывать эффект повышения термической стабильности [11].

Влияние высоких концентраций ТМАО и бетаина на ассоциацию ферментов гликогенолиза, а также на взаимодействие этих ферментов с гликогеном согласуется с теоретически предсказанными эффектами молекулярного краудинга. Обнаружено влияние краудинга на взаимодействие Phb с аллостерическим эффектором – FAD. При взаимодействии Phb с FAD в условиях краудинга происходит конформационный переход димерной молекулы, в результате которого появляются кооперативные взаимодействия флаavin-связывающих центров фермента. Поскольку константы связывания лигандов с белками изменяются в условиях краудинга, можно ожидать, что краудинг будет оказывать влияние на взаимодействие лекарственных препаратов с белками-мишенями. Известно, что фосфоорилаза является мишенью для испытания противодиабетических препаратов. Проведенные исследования показывают, что эффекты краудинга должны учитываться при испытании новых лекарственных препаратов. Оценивая возможную практическую значимость исследований протекания биохимических процессов в условиях краудинга для медицины, следует также принимать во внимание, что целый ряд заболеваний (таких как нейродегенеративные болезни) связаны с образованием нефункциональных белковых агрегатов, формирование которых стимулируется в условиях краудинга. Защитный стабилизирующий эффект осмолитов при стрессах различной природы – термическом, химическом или осмотическом – в ряде случаев объясняется эффектом исключенного объема. Также показано защитное действие молекулярного краудинга, создаваемого осмолитами (ТМАО, бетаином, пролином и глицином), при инактивации Phb под действием гуанидингидрохлорида. Методические приемы стабилизации белков, основанные на использовании

эффектов краудинга, могут быть использованы при решении биотехнологических задач и при разработке методов хранения белковых препаратов медицинского назначения [11].

1.3 Влияние вязких сред на ферментативные реакции

Во всех клетках присутствует жидкая фаза, в которой протекает значительная часть основных реакций метаболизма [10]. Вязкость является одним из фундаментальных параметров водной среды, от которого зависят протекающие в ней физико-химические процессы. Учитывая пространственную неоднородность внутриклеточной среды, измерения вязкости *in vivo*, как правило, охватывают определенную область клетки, в которой находится зонд, и характеризуют то, что можно назвать "микровязкостью" [10].

При добавлении различных вязких агентов в водную среду неизбежно меняются физико-химические свойства раствора, а также не исключается возможность специфического (химического) взаимодействия этих веществ с ферментами. Поэтому для выявления эффекта непосредственно вязкости на протекание ферментативной реакции необходимо проводить измерения в растворах с добавлением вязких агентов разной природы, молекулярной массы и др.

Считается, что вязкость может воздействовать на ферментативные реакции по двум принципиальным механизмам: посредством снижения коэффициента молекулярной диффузии, который обратно пропорционален вязкости среды, или через снижение конформационной подвижности фермента.

Для последнего механизма справедлива формула:

$$k_{obs} = \frac{k}{\eta_{rel}^{\delta}}, \quad (3)$$

$$\frac{k}{k_{obs}} = \eta_{rel}^{\delta}, \quad (4)$$

где η_{rel} – это относительная вязкость, определяемая как отношение вязкостей реакционного раствора в присутствии и отсутствии вязкого агента, δ – константа сопряжения, определяющая чувствительность реакции к вязкости растворителя. Её значения могут варьировать от 0 до 1, $\delta = 0$ для реакций ферментов, у которых активный центр изолирован от среды и 1 – для ферментов с активным центром, плотно взаимодействующим со средой.

1.4 Экспериментальные методы регистрации нестационарной кинетики

1.4.1 Основные принципы регистрации нестационарной кинетики

Среди различных способов изучения кинетики быстрых реакций выделяется группа методов, отличающаяся некоторыми общими особенностями и называемая струевыми методами. Имеются три струевых метода, известных как методы непрерывной струи (continuous-flow), ускоренной струи (accelerated-flow) и остановленной струи (stopped-flow). Два раствора реагирующих веществ можно смешать за время меньше секунды, соединяя быстрые струи этих растворов в соответствующим образом сконструированной смесительной камере. За дальнейшим течением реакции в смеси можно следить одним из существующих способов в зависимости от того, как быстро можно осуществить наблюдения и сколько раствора имеется в распоряжении [14].

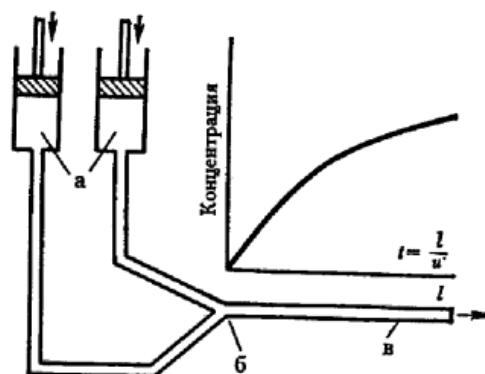


Рисунок 4 - Принципиальная схема установки, используемой в методе непрерывной струи: а - растворы реагирующих веществ; б - смесительная камера; в - трубка для наблюдений [12]

В методе непрерывной струи два раствора с разными реагентами поступают в смесительную камеру, а затем в трубку (трубчатый реактор), в которой на некотором расстоянии от места смешения определяют концентрацию одного из реагентов или продуктов реакции по оптической плотности или электропроводности раствора (рис. 4). Время протекания реакции прямо пропорционально расстоянию, пройденному реакционной смесью от смесительной камеры до места в трубке, где проводят измерения. Меняя скорость потока и расстояние от точки смешения до места измерения, можно получить данные для построения кинетической кривой. В смесительной камере специальной конструкции смешение достигается за 1-2 мс. Это позволяет изучать кинетику реакций со временем полупревращения, равным несколько мс. На проведение опыта требуется от 0,3 до 1 л раствора. Погрешность измерения константы скорости составляет 2-5%.

В методе ускоренной струи концентрации реагентов определяют в фиксированной точке потока, когда скорость реакции непрерывно меняется. Растворы реагентов помещают в двух шприцах. Их поршни приводят в движение вручную надавливанием на скользящий блок. Резкий толчок вызывает ускоренный поток реакционной смеси (в течение около 0,1 с). Время, прошедшее от начала реакции до момента наблюдения, обратно

пропорционально скорости потока и в ходе опыта уменьшается. Поступательное движение скользящего блока через потенциометр преобразуют в напряжение, которое подают на X-пластины осциллографа. На Y-пластины подают напряжение с выхода спектрофотометра. Таким образом, на экране осциллографа получают кинетическую кривую. По этой кривой можно вычислить константу скорости реакции. Минимальное время полупревращения реагента, доступное измерению, составляет 1 мс; на один опыт расходуется всего 0,1 см³ раствора; диапазон измеряемых констант скорости составляет 10²-10⁷ л·моль⁻¹·с⁻¹.

В методе остановленной струи быстро смешивают два раствора реагирующих веществ, подавая их в смесительную камеру, а полученный при смешивании раствор вытекает по трубке. Поток резко останавливают, так что раствор становится неподвижным за 1–2 мс. Элемент раствора, который остановился, скажем, в 10 мм от смесительной камеры, смешивается в течение нескольких миллисекунд. Далее следят за реакцией в этом фиксированном элементе раствора, проводя наблюдения в этой точке каким-либо быстрым методом, например, при помощи фотоэлектрической фотометрии. Временная шкала метода простирается от миллисекунд до нескольких минут и смыкается со временами, доступными измерению обычными методами.

Эффективное действие аппаратуры метода остановленной струи зависит от нескольких факторов (рис. 5). Чтобы произошло полное смешивание, точка наблюдения должна находиться в нескольких миллиметрах от смесительной камеры, но она не должна находиться слишком далеко, так как время между смешиванием и наблюдением необходимо сделать минимальным. Наконец, необходимо очень быстро останавливать поток по следующей причине: эффективность смешивания падает, если течение слишком медленное; следовательно, если скорость течения уменьшается постепенно, жидкость, которая остановилась в точке наблюдения, могла бы быть смешанной не полностью и вначале эффективная

скорость реакции была бы слишком низкой. Кроме того, чем более резкой будет остановка, тем более быстрые реакции можно наблюдать [15, 16]. Принципиальная схема установки, используемой в методе остановленной струи приведена на рисунке 5.

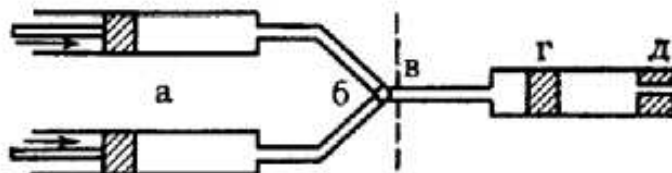


Рисунок 5 – Принципиальная схема установки, используемой в методе остановленной струи: а - растворы реагирующих веществ; б - смесительная камера; в - точка наблюдения; г - останавливающий поршень; д - ограничитель

Некоторые меры повышения сигнала при регистрации методом остановленной струи приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Способы усиления сигнала при регистрации методом остановленной струи

Изъята 1 таблица

1.4.2 Изучение биолюминесцентных реакций с помощью метода остановленной струи

Ранее метод стоп-флоу был использован для изучения механизма реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, выделенной из *Vibrio harveyi*. Были получены некоторые оптические и кинетические параметры. Образование и распад различных интермедиатов реакции обнаруживали измерением поглощения на длинах волн 380 и 445 нм и регистрацией испускания видимого света. Были измерены кинетические кривые по поглощению флавина на длинах волн 380 и 445 нм, а также по биолюминесценции реакции. Образование FMNOOH наблюдали при длине волны 380 нм при разных концентрациях фермента, FMNH₂, кислорода и длинноцепочечного альдегида. Была измерена константа скорости второго порядка образования FMNOOH из комплекса люцифераза-FMNH₂, равная $2,4 \cdot 10^6 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Было установлено, что в отсутствие деканала этот комплекс распадается на FMN и H₂O₂ с константой скорости $0,1 \text{ с}^{-1}$. За образованием FMN из FMNOH наблюдали при длине волны 380 нм. На основе измерений были построены кинетические модели, отражающие зависимость оптических показателей от времени. В качестве примера (рис. 6) приведена кинетика формирования комплекса люцифераза-FMNOOH [17].

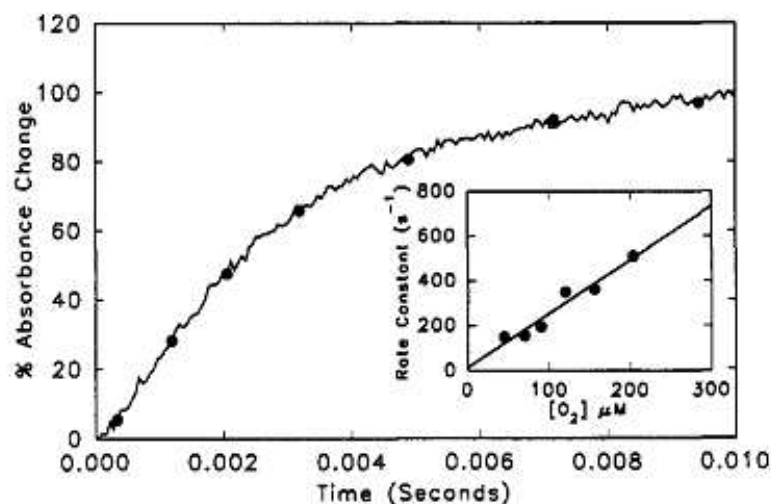


Рисунок 6 – Зависимость поглощения при 380 нм от времени (формирование комплекса люцифераза–FMNOOH) [17]

Также данный метод использовали для изучения эффектов длинноцепочечного альдегида и его аналогов (трифторметилловые кетоны, бороновые кислоты, спирты и карбоновые кислоты) на кинетический механизм бактериальной биолюминесцентной реакции, а именно на формирование и стабильность интермедиата 4а-гидропероксид флавина [18]. В результате было установлено, что длительность вспышки зависит от длины цепи альдегида. Хотя интенсивность излучения была различной для каждого альдегида, квантовый выход реакции не зависел от длины цепи альдегида. Было также установлено, что аналог *n*-алкилальдегида действует подобно альдегиду, очевидно формируя тройной комплекс с люциферазой и восстановленным флавином, уменьшая при этом скорость формирования FMNOOH. Для получения вышеизложенных результатов были зарегистрированы следующие характеристики:

1) время реакции комплекса люцифераза-FMNH₂-деканаль с кислородом при разных концентрациях деканала (по кинетике поглощения на длине волны 380 нм);

2) время реакции комплекса люцифераза-FMNH₂-деканаль с кислородом при разных концентрациях кислорода (по кинетике поглощения на длине волны 380 нм);

3) интенсивность биолюминесценции в зависимости от длины цепи альдегида;

4) эффекты альдегидных аналогов на формирование и распад интермедиата 4а-гидропероксид флавина (по кинетике поглощения при 380 и 445 нм) [18].

Также методом остановленной струи наблюдали кинетику сворачивания светляковой люциферазы по изменению интенсивности собственной люминесценции фермента [19]. В ходе работы были измерены биолюминесценция и энергия активации фермента с использованием люминометра, его флуоресценция при помощи флуориметра. Для изучения вторичной и третичной структур был применен метод кругового дихроизма. Результаты показали, что энергия активации люциферазы повышается в присутствии трегалозы, однако уменьшается при добавлении Mg₂SO₄. Согласно кинетике флуоресценции, снятой методом стоп-флоу (рисунок 7), константа скорости сворачивания фермента увеличивается в присутствии Mg₂SO₄, но уменьшается при добавлении трегалозы. Это говорит о том, что среда влияет на структурные и функциональные свойства фермента. Трегалоза выступает в качестве агента, повышающего вязкость среды, вследствие чего замедляется динамическая подвижность люциферазы. Сульфат магния, наоборот, помогает ферменту достичь наиболее выгодное энергетическое состояние.

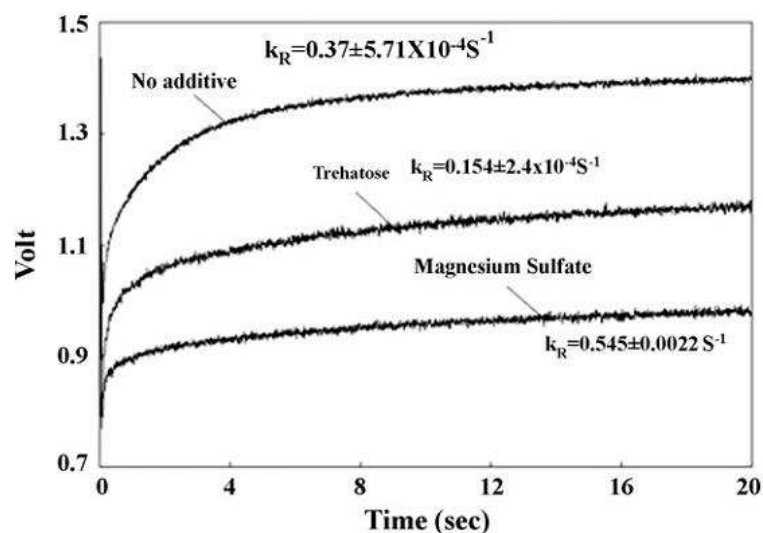
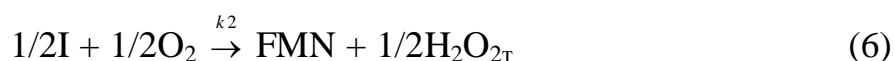


Рисунок 7 – Кинетика флуоресценции люциферазы светляков при добавлении трегалозы и Mg_2SO_4 [19]

1.4.3 Кинетика автоокисления восстановленного флавинмононуклеотида кислородом

Ранее было показано, что окисление восстановленного $FMNH_2$ кислородом – автокаталитический процесс, т.к. окисленная и восстановленная форма флавинмононуклеотида взаимодействует с образованием интермедиата, способного реагировать с кислородом.

Была предложена следующая схема окисления флавина:



где I – семихинон [20], J – флавин-кислородный комплекс [21].

Также были получены кинетические кривые реакции FMNH₂ (15 μM) с O₂ (120 μM) по поглощению на длинах волн 380 и 445 нм. Кинетические кривые образования FMN, измеренные на обеих длинах волн очень похожи, и каждая имеет отличительную лаг фазу, с последующей экспоненциальной стадией (рис. 8).

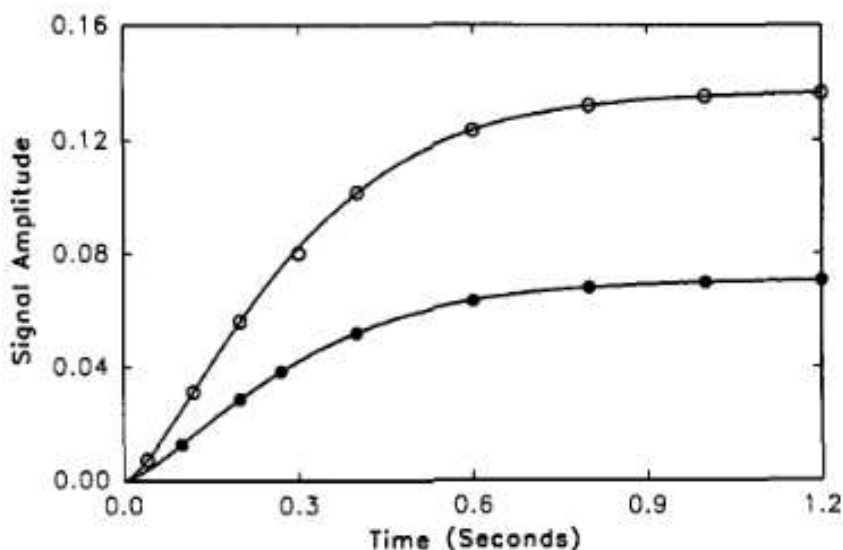


Рисунок 8 – Кинетические кривые реакции FMNH₂ (15 μM) с O₂ (120 μM) измеренные при длинах волн 380 (●) и 445 (○). Сплошные линии соответствуют экспериментальным данным, точки соответствуют аппроксимации кривых, по которым были получены константы k₁ и k₂ равные 4,7 и 11,5 с⁻¹ соответственно

Кинетические кривые для этой реакции были обработаны согласно уравнению (8), в результате чего были получены значения для k₁ и k₂ 4,7 и 11,5 с⁻¹, соответственно [17].

$$y=1 + [1/(k_1 - k_2)](k_2e^{-k_1t} - k_1e^{-k_2t}) \quad (8)$$

2 Материалы и методы

2.1 Реактивы и оборудование

В работе были использованы следующие реактивы:

- флаavinмоноклеотид (Sigma); концентрацию определяли спектрофотометрически по коэффициенту молярной экстинкции при длине волны 445 нм ($\epsilon_{445}=12200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$);
- EDTA (ROTH); в качестве стабилизатора при фотовосстановлении FMN использовали раствор EDTA 0,03 М в фосфатном буфере;
- рекомбинантная люцифераза бактерий *Photobacterium leognathi* (Институт биофизики СО РАН); раствор готовили добавлением в лиофилизированный препарат люциферазы калий-фосфатного буфера (0,05 М, рН 6.8);
- деканаль (Sigma), спиртовой раствор содержал 2 мМ альдегида;
- фиколл (Sigma); готовили растворы с содержанием фиколла 5, 10, 15 и 20 %; фиколл растворяли фосфатным буфером; вязкость растворов составляла 2, 2.5, 6, 10 сР, соответственно;
- сахароза (GERBU); готовили растворы с содержанием сахарозы 10, 20, 30, 40 и 50%; сахарозу растворяли фосфатным буфером; вязкость растворов составляла 1.3, 1.9, 3.2, 6.2 и 15,4 сР, соответственно.

Кинетику реакции регистрировали на анализаторе кинетики быстрых процессов SX-20 (Applied Photophysics), оснащенном термостатируемой измерительной ячейкой. Реагенты помещали в пластиковые шприцы (10 мл), которые соединяли с внутренними шприцами установки. Эксперименты проводили при 20 °С.

Для фотовосстановления FMN использовали светодиод с максимумом испускания на длине волны 460 нм.

Спектры поглощения компонентов регистрировали с помощью спектрофотометра Cary 5000 (Agilent Technologies).

Для взвешивания использовали аналитические весы Adventurer (Ohaus, США) с разрешением 0,1 мг.

2.2 Методика эксперимента

Получение фотовосстановленного FMN

Фотовосстановление FMN проводили в присутствии 0,01 М EDTA.

Перед фотовосстановлением проводили удаление кислорода из раствора с помощью барботирования аргоном в течение 5 минут. Фотовосстановление FMN проводили во внутреннем шприце анализатора кинетики быстрых процессов облучением светодиодом в течение 10 минут, пока раствор не становился прозрачным.

Регистрация кинетики реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в вязких средах

Кинетику биолюминесцентной реакции в вязких средах регистрировали с помощью анализатора SX-20 в режиме флуоресценции. В первый шприц помещали раствор восстановленного флавинмононуклеотида, приготовленный по вышеуказанному методу, с различным содержанием фиколла или сахарозы и различных концентрациях деканала. Во втором шприце находился раствор люциферазы в соответствующем растворителе (буфер с фиколлом или сахарозой) (таблица 1).

Параметры SX-20 при регистрации кинетики биолюминесцентной реакции:

- напряжение на ФЭУ: 400 В;

- время регистрации: 15 секунд;
- число точек: 3000;
- число повторений 10.

Таблица 2 – Состав смесей для анализатора SX-20

Изъята 1 таблица

Аппроксимацию участка кинетических кривых осуществляли при помощи программы OriginPro (рис. 9) с использованием уравнения:

$$y = A * \exp(-x * k) + y_0 \quad (9)$$

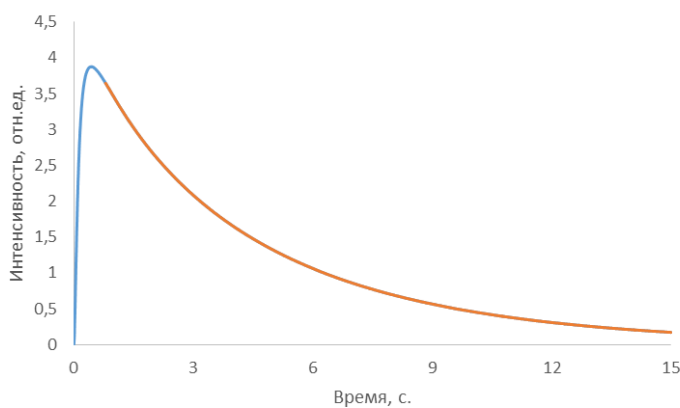


Рисунок 9 – Пример аппроксимации спада свечения

Численное моделирование реакции, катализируемой бактериальной люциферазой

Численное моделирование кинетики реакции осуществляли в программном пакете SciLab. Проводили численное решение системы уравнений, связывающих концентрации реагентов и константы скорости разных стадий реакции. Получаемые кинетические кривые должны были максимально совпадать с экспериментальными данными. Достоверность получаемых результатов контролировали несколькими способами: по относительному отклонению модельных кривых от экспериментальных, по кинетике интермедиатов реакции, по соответствию получаемых констант известным литературным данным.

3 Результаты и обсуждение

3.1 Кинетика реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в вязких средах

Была зарегистрирована кинетика биолюминесцентной реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в средах с разным содержанием фикола и сахарозы (табл. 2, эксперимент 1 и 2), и при вариации концентрации альдегида. На рисунке 10 представлены полученные кинетические кривые. Видно, что с ростом концентрации краудинг-агента и вязкого косольвента происходит уменьшение максимальной интенсивности, замедляется спад свечения, увеличивается время выхода на максимум.

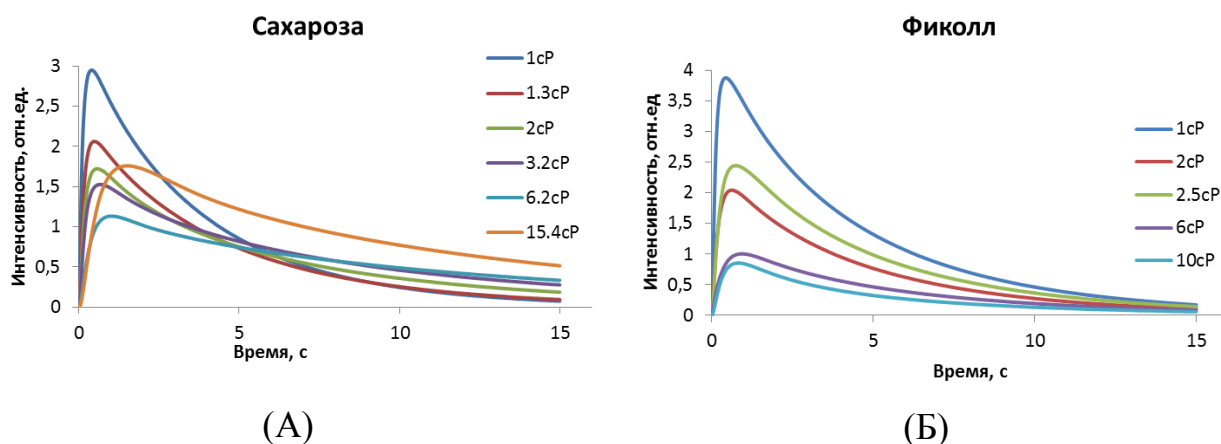


Рисунок 10 – Кинетические кривые реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в средах с сахарозой (А) и фикоаллом (Б) при концентрации деканала 10 μM

Была получена зависимость времени выхода на максимум и квантового выхода от вязкости среды (рис. 12 и 13). Под квантовым выходом здесь мы понимаем общее количество квантов света, испускаемое за один оборот фермента данной концентрации (рис. 11).

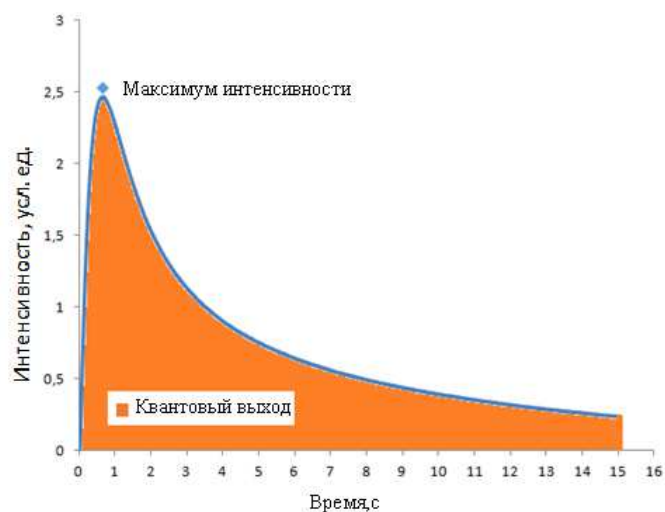


Рисунок 11 – Кинетическая кривая реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, и определяемые параметры

Изъят 1 рисунок

Рисунок 12 – Изменение времени выхода на максимум в модельных средах в присутствии сахарозы (А) и фикола (Б)

По рис. 12 видно, что при одних и тех же значениях вязкости среды зависимость времени выхода на максимум близка к линейной в средах с сахарозой и имеет форму кривой насыщения в средах с фикола. Это может свидетельствовать о разных механизмах воздействия двух модельных сред на стадию реакции, ответственную за выход свечения на максимум.

Изъят 1 рисунок

Рисунок 13 – Изменение квантового выхода реакции в модельных средах в присутствии сахарозы (А) и фиколла (Б)

Наблюдаются отличия в зависимости квантового выхода от концентрации низко- и высоко-молекулярного косольвента. В случае сахарозы квантовый выход существенно не изменяется. В условиях макромолекулярного краудинга, моделируемого фиколлом, квантовый выход падает значительно при всех концентрациях альдегида.

Время выхода на максимум свечения, характеризующее скорость лимитирующего процесса на начальной стадии реакции, демонстрирует схожую тенденцию для сахарозы и фиколла – с ростом вязкости выход на максимум замедляется.

Изменение времени выхода на максимум позволяет провести оценку степени сопряжения реакционного центра, где происходит лимитирующая стадия, с вязкой средой. Для этого анализировали скорость выхода на максимум (k_{\max}) – величину, обратную времени выхода на максимум. Константы сопряжения, полученные по тангенсу угла наклона в двойных логарифмических координатах, оказались 0,47–0,5 для сред с сахарозой и 0,40–0,42 – с фиколлом (рис.14).

Изъята 1 страница

3.2 Численное моделирование нестационарной кинетики реакции

Биолюминесцентная реакция бактерий представляет собой сложный, многостадийный процесс, связанный с последовательным образованием нескольких интермедиатов. Детальное понимания эффектов вязких сред невозможно без вычленения констант скоростей отдельных стадий этой реакции. С этой целью была предпринята попытка описать экспериментальные кинетические кривые при помощи модели, реализованной в пакете прикладных математических программ SciLab. Схема, взятая за основу модели, состоит из 5-ти основных стадий (рис. 16).

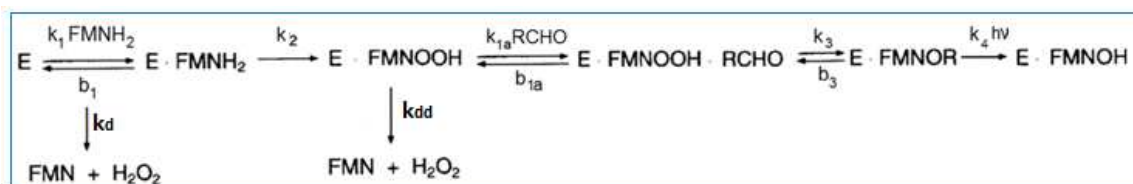


Рисунок 16 – Схема реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, заложенная в математическую модель

Одновременная аппроксимация трех кинетических кривых с различными концентрациями альдегида позволила получить набор из 10 индивидуальных кинетических констант, отвечающих скоростям формирования и распада различных интермедиатов. Пример описания экспериментальных кривых представлен на рисунке 17.

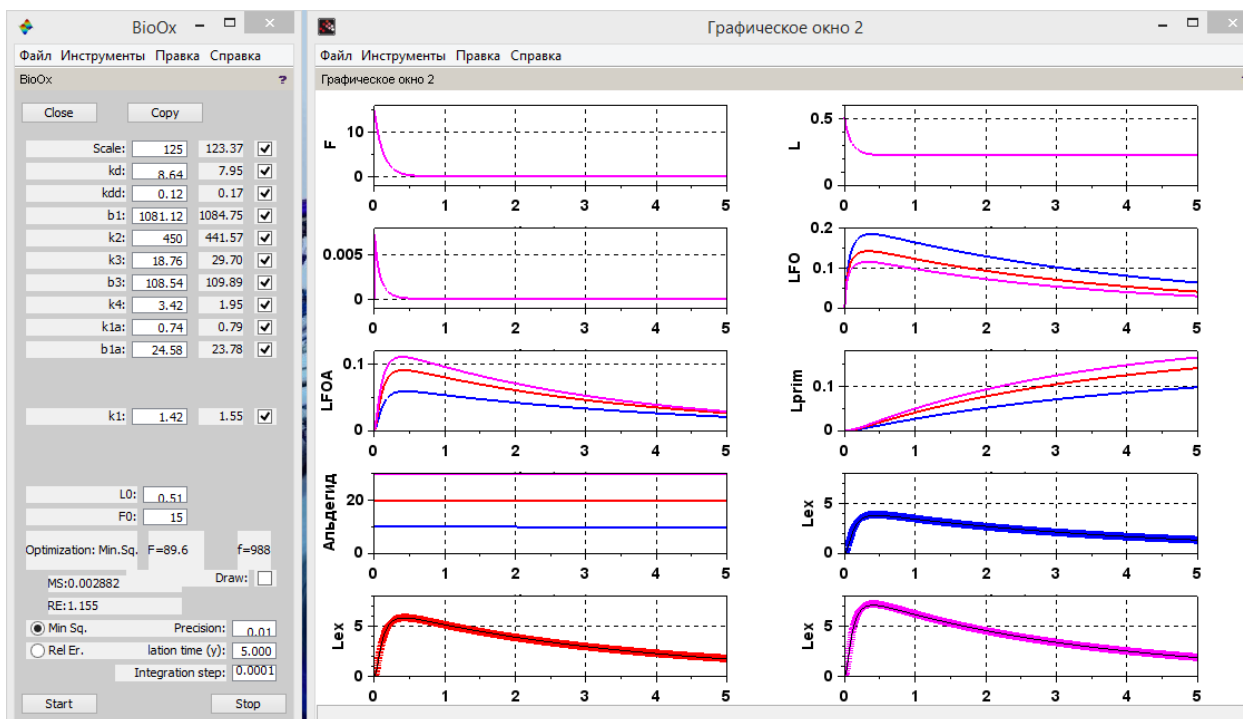


Рисунок 17 – Пример моделирования кинетических кривых реакции, катализируемой бактериальной люциферазой

Применение модели для описания кинетических кривых биолюминесцентной реакции, полученных в средах различной вязкости и в условиях краудинга, позволило оценить влияние среды на отдельные стадии биолюминесцентной реакции.

Получение констант скорости отдельных стадий реакции позволяет провести оценку степени сопряжения реакционного центра, где происходит лимитирующая стадия, с вязкой средой (табл. 3–4). В таблице 5 представлены константы сопряжения, полученные по тангенсу угла наклона в двойных логарифмических координатах.

Изъята 1 страница

Таблица 5 – Константы сопряжения отдельных стадий реакции со средой (δ)

Стадия реакции	δ	
	+сахароза	+ фиколл
k_d	-0,58	-0,47
k_1	-0,76	-0,46
k_2	–	–
k_3	-0,15	-0,10
k_4	+0,29	+0,39
k_{1a}	-1,03	-1,17

Опираясь на константы сопряжения, можно предположить, что стадия связывание люциферазы с флавином (k_1) лимитирует скорость выхода на максимум. Также отличается от остальных стадия распада возбуждённого интермедиата (k_4), которая ускоряется в модельных средах ($\delta > 0$). Кроме того, по значению $|\delta| > 1$ видно, что стадия связывания альдегида (k_{1a}) имеет дополнительный механизм влияния среды, кроме вязкости.

ВЫВОДЫ

- В присутствии высоко- и низко-молекулярного косольвента наблюдаются схожие зависимости от вязкости среды как для эмпирических (k_{\max} , $k_{\text{сп}}$), так и для модельных констант скоростей отдельных стадий реакции, катализируемой бактериальной люциферазой. Это говорит о том, что вязкость – существенный механизм влияния среды на биолюминесцентную реакцию бактерий.

- Скорость выхода свечения на максимум лимитируется стадией связывания флавинмононуклеотида с люциферазой (k_1) и характеризуется высокой константой сопряжения активного центра фермента со средой.

- Константа связывания фермент-субстратного комплекса с молекулярным кислородом (k_2) не подвержена влиянию вязкости.

- Стадия связывания альдегида с фермент-субстратным комплексом (k_{1a}) демонстрирует диффузионную зависимость от вязкости среды ($\delta \approx 1$).

- Стадия распада тройного интермедиата, сопряженная с формированием возбужденного состояния, (k_4) ускоряется в модельных средах с ростом концентрации косольвента.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

C₁₀ – дециловый альдегид

cP – сантипуаз

EDTA – этилендиаминтетрауксосная кислота

FMN – флавинмононуклеотид

FMNH₂ – флавинмононуклеотид восстановленный

H₂O – вода

O₂ – молекулярный кислород

RCHO – длинноцепочечный альдегид

RCOOH – карбоновая кислота

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Tinikul, R. Structure, mechanism and mutation of bacterial luciferase/ Tinikul R., Chaiyen P. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2014. – С. 47-74.
2. Lin L. Y. C., Meighen E. A. Bacterial bioluminescence // Opin Struct Biol. – 2009. – Т. 5. – С. 798-809.
3. Бондарь, В. С., Высоцкий, Е. С., Есимбекова, Е. Н [и др.]; под ред. О. Шимомуры, И. И. Гительзона. / В. С. Бондарь, Е. С. Высоцкий, Е. Н. Есимбекова, [и др.]; под ред. О. Шимомуры, И. И. Гительзона. // Физика и химия билюминесценции : учеб. пособие / Сиб. федер. ун-т. – Красноярск, 2012. – 218 с.
4. Penzkofer A. Photo-inuced reduction of flavin mononucleotide in aqueous solutions/ S.H. Song, B. Dick, A. Penzkofer // Chemical Physics 322 (2007) 55-65
5. Surdhar P. S. et al. The reduction of lumiflavin by EDTA radicals and evidence for association of EDTA with flavinsemiquinone //International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry. – 1988. – Т. 32. – №. 1. – С. 15-21.
6. Prasad D. R., Mandal K., Hoffman M. Z. Solution medium control of the Ru (bpy) 3 2+/methyl viologen/EDTA photochemical system //Coordination Chemistry Reviews. – 1985. – Т. 64. – С. 175-190.
7. Enns K., Burgess W. H. The Photochemical Oxidation of Ethylenediaminetetraacetic Acid and Methionine by Riboflavin1 //Journal of the American Chemical Society. – 1965. – Т. 87. – №. 24. – С. 5766-5770.
8. Flavoenzymes, 1, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, p. 171. (1982)

9. Гагарская Ю. А., Поварова О. И. Моделирование густонаселенной среды клетки макромолекулярными краудинг агентами //Современные тенденции развития науки и технологий. – 2016. – С. 64.
10. Чеботарева, Н. А. Влияние молекулярного краудинга на ферменты гликогенолиза / Н. А. Чеботарева // Успехи биологической химии. - 2007. - № 47. – С. 233-258.
11. Чеботарева, Н. А., Курганов Б.И., Ливанова Н.Б. Биохимические эффекты молекулярного краудинга. / Н. А. Чеботарева // Биохимия. - 2004. - № 69. – С. 1522-1536
12. Пучков, Е. О. Внутриклеточная вязкость: методы измерения и роль в метаболизме/ Е. О. Пучков // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2014. – № 31. – С. 3-13.
13. Abu-Soud, H. Stopped-flow kinetic analysis of the bacterial luciferase reaction/A. Husam, L.S. Mullins, T. O. Baldwin, F. M. Raushel// Biochemistry 1992, 31, 3807-3813
14. Baldwin T., Nicoli M., Becvar J., Bacterial luciferas:binding of oxidizedflavin mononucleotide. //J. Biol. Chem. 1975, p.2763-2768.
15. Sukovataya I.E., Kratasyuk V.A, Effect of pH of reaction media on kinetic parameters of coupled enzyme system NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase in solvents of increased viscosity // Luminescence, 2010. V.25, N2. p.188-189.
16. Nemtseva E.A., Gulnov D.V., Gerasimova M.A., Photophysical characteristics of flavinmononucleotide in viscous media // Luminescence, 2010. V.25, N2. p.191.
17. Abu-Soud , H. Stopped-Flow Kinetic Analysis of the Bacterial Luciferase Reaction/A. Husam, L.S. Mullins, T. O. Baldwin, F. M. Raushel// Biochemistry 1992, 31, 3807-3813

18. W. A. Francisco. Interaction of Bacterial Luciferase with Aldehyde Substrates and Inhibitors/ W. A. Francisco, A. Husam, T.O. Baldwin, F.M. Raushel// J. Biol. Chem. – 1993. – № 33. – C. 24734–24741.
19. M.R.Ganjalikhanya. Roles of trehalose and magnesium sulfate on structural and functional stability of firefly luciferase /M.R. Ganjalikhanya, B. Ranjbara, S. Hosseinkhani ,K. Khalifeha, L.Hassani// Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 62 (2010) 127–132
20. Gibson Q.H. The Oxidation of Reduced Flavin Mononucleotide by Molecular Oxygen / Q. H. Gibson, J. W. Hastings // Biochem. (1962) 83, 377
21. Gutfreund H. The control of some oxidative pathways in guinea-pig mammary-gland mitochondria / H. Gutfreund, Jones E. A. // Biochem. (1961) 79, 614

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 В.А. Кратасюк

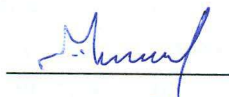
« 9 » 06 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 – Физика

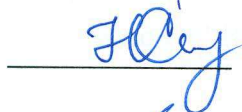
**Моделирование нестационарной кинетики биолюминесцентной
реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, в присутствии
краудинг-агента фиколла**

Руководитель



Лисица А.Е.

Научный консультант



канд. физ.-мат. наук Немцева Е.В.

Выпускник



Прокопишко Ю.В.

Красноярск 2018