

БУХАРИНА НАТАЛЬЯ СЕРГЕЕВНА

**ВИЗУАЛИЗАЦИЯ И МОНИТОРИНГ АКТИВНОСТИ  
ЦИТОХРОМА P450 BM3  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ**

03.01.04 - Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

МОСКВА

2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «ИБМХ» РАМН)

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор  
**Иванов Юрий Дмитриевич**

**Официальные оппоненты:**

**Дзантиев Борис Борисович**  
доктор химических наук, профессор,  
ФГБУН Институт биохимии им. А.Н. Баха  
РАН, заместитель директора института по  
научной работе

**Козин Сергей Александрович**  
кандидат биологических наук, ФГБУН  
Институт молекулярной биологии им. В.А.  
Энгельгардта РАН, лаборатория  
конформационного полиморфизма белков  
в норме и патологии, старший научный  
сотрудник

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки «Научно-  
исследовательский институт физико-  
химической медицины Федерального  
медико-биологического агентства»

Защита состоится «25» сентября 2014 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 при ФГБУ «ИБМХ» РАМН по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10., корп. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ИБМХ» РАМН и на сайте [www.ibmc.msk.ru](http://www.ibmc.msk.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,  
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность исследования.**

Актуальность изучения ферментативных систем обусловлена их определяющей ролью в осуществлении важных биохимических реакций. Стандартным исследовательским подходом является изучение не единичных макромолекулярных ферментативных систем, а одновременно большого числа молекулярных систем и наблюдение усредненных по ансамблю свойств. Это обусловлено тем, что чувствительность прежних аналитических систем была невысокой и не позволяла проводить измерения свойств единичных молекул ферментов. В последнее десятилетие наблюдается большой интерес к исследованию единичных молекул ферментов, их свойств и активности, что легло в основу развития нового направления в биохимии – энзимологии единичных молекул, и обусловило актуальность развития новых методов их анализа. Изучение функционирования единичных молекул ферментов имеет определенные преимущества перед традиционным подходом. Основное преимущество заключается в получении информации о распределении молекулярных свойств отдельных биомолекул, а не об усредненных по ансамблю величинах, например, возможность напрямую наблюдать за стадиями (ан)фолдинга белка, наличие которых в стандартных экспериментах лишь предполагается, или наблюдать за работой единичных ферментов на различных стадиях реакции (Xie X.S. et al., 2001). Также следует отметить, что наблюдение за ферментной системой на уровне единичных молекул позволяет избежать влияния концентрационных факторов на результаты исследований. Например, некоторые биологические молекулы склонны к агрегации при высоких концентрациях, тогда как работа с малыми концентрациями или с единичными иммобилизованными молекулами позволяет следить за свойствами мономеров и олигомеров.

В настоящей работе для изучения ферментативных систем использован подход на основе атомно-силовой микроскопии (АСМ). Этот метод предоставляет принципиальную возможность визуализировать и определять физико-химические свойства отдельных биомолекул. Субнанометровое вертикальное разрешение этого метода позволяет с высокой точностью определять высоту белка с

минимальным воздействием на него со стороны АСМ-зонда. Таким образом, АСМ можно использовать для визуализации белков, определения высот белковых молекул и, соответственно, определения их олигомерного состояния, а также для мониторинга конформационной динамики фермента в процессе ферментативной активности, что было продемонстрировано в данной работе на примере фермента цитохрома P450 BM3 (BM3).

BM3 принадлежит к суперсемейству гем-содержащих цитохромов P450 и катализирует монооксигенацию жирных кислот (Miura Y. et al., 1974). Этот белок является самодостаточным ферментом, в котором редуктазный и гемовый домены объединены в единую полипептидную цепь, что обуславливает интерес к нему как к удобной упрощенной модели цитохром P450-содержащих монооксигеназных систем (Narhi L.O. et al., 1987). Поэтому BM3 был выбран в качестве объекта исследования.

**Цель исследования** – визуализация и измерение активности отдельных молекул фермента цитохрома P450 BM3 с использованием АСМ.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Подбор условий нековалентной иммобилизации фермента на АСМ-подложку для визуализации отдельных молекул.
2. АСМ-визуализация иммобилизованного фермента в различных средах, определение его олигомерного состояния на основе данных измерений с использованием стандартных и сверхтонких зондов.
3. Исследование влияния температуры на олигомерное состояние BM3 методами АСМ и флуоресцентного анализа.
4. АСМ-измерение амплитуды колебаний высоты молекул BM3 на отдельных стадиях каталитического цикла (при добавлении субстрата, донора электронов, ингибитора) при разных температурах и разработка методики определения каталитической активности ферментов из полученных АСМ-данных.

**Научная новизна.**

1. Разработана методика определения олигомерного состояния иммобилизованного фермента BM3 с помощью АСМ с двумя типами зондов: стандартным и сверхтонким. Исследовано влияние среды АСМ-измерений

(жидкость, воздух, вакуум) и типов АСМ-зондов на высоты изображений фермента ВМЗ и на его олигомерное состояние. С использованием АСМ-измерений стандартным зондом получено подтверждение, что ВМЗ в жидкости может находиться как в мономерном, так и в олигомерном состоянии, а с использованием сверхтонкого зонда в вакууме удалось разрешить более детально олигомерное состояние ВМЗ.

2. Разработана методика определения каталитической активности фермента с помощью АСМ по изменению амплитуды колебаний высоты его отдельных молекул. Показана зависимость амплитуды колебаний высоты отдельных молекул ВМЗ, иммобилизованных на подложке, от температуры с помощью АСМ.
3. Проведено исследование температурной денатурации цитохрома Р450 ВМЗ методами АСМ и флуоресцентного анализа. Предложен подход для выяснения взаимоотношения зависимости активности фермента от температуры и его температурной денатурацией, который объединяет мониторинг плавления фермента и АСМ-исследование его агрегации в процессе температурной денатурации. В низкотемпературной области 10-33°C с помощью флуоресцентного анализа было обнаружено 3 кооперативных перехода, а с помощью АСМ-анализа для ВМЗ продемонстрировано сохранение его глобулярной формы при изменении степени олигомеризации в этой области.

**Практическая значимость.** Результаты диссертации носят в первую очередь фундаментальный характер. По мнению автора, наиболее интересны следующие полученные результаты: детальное разрешение олигомерного состояния ВМЗ с помощью сверхтонкой АСМ-иглы, определение особенностей колебаний высоты отдельных молекул фермента ВМЗ, иммобилизованных на подложке, и обнаружение 3-х кооперативных переходов в низкотемпературной области на кривой плавления ВМЗ.

Важным методологическим результатом диссертации является разработанный алгоритм связи каталитической активности единичного фермента и амплитуды колебаний его высоты, полученной из АСМ-данных. Таким образом, настоящая работа вносит как практический, так и теоретический вклад в развитие

методов определения каталитической активности единичных молекул ферментов. Этот подход может быть использован для других ферментативных систем.

Предложен подход совмещения АСМ с флуоресцентным анализом для исследования температурной денатурации ферментов.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. ВМЗ в жидкости и воздухе может находиться как в мономерном, так и в олигомерном состоянии, что было показано с помощью АСМ.
2. Разработана методика оценки каталитической активности единичной молекулы фермента ВМЗ по изменению амплитуды колебаний ее высоты, наблюдаемой в АСМ-экспериментах.
3. Плавление ВМЗ в диапазоне температур 10-33°C происходит через 3 кооперативных перехода, при которых сохраняется глобулярная форма белка, но изменяется степень его олигомеризации.

**Внедрение результатов исследования.** Предложенный способ исследования цитохрома ВМЗ на уровне единичных молекул может быть использован в фундаментальных исследованиях, направленных на изучение других ферментативных систем. Фундаментальные результаты, полученные в диссертационной работе, могут быть использованы в прикладных исследованиях, посвященных разработке новых биокаталитических технологий на основе иммобилизованных ферментов для решения задач фармацевтической, пищевой и энергетической промышленности.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были изложены в докладах на следующих научных конференциях: Первая международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» 2010, Москва, Россия; 25th International Symposium on Microscale BioSeparations MSB 2010, Prague, Czech; 4-я международная конференция «Современные достижения бионаноскопии» 2010, Москва, Россия; VI Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» 2011, Москва, Россия; 17th International Conference on Cytochrome P450 2011, Manchester, UK; European Proteomics Association 2012 Scientific Congress, Glasgow, Scotland.

**Личный вклад автора.** Все экспериментальные АСМ-измерения и подготовка образцов к сканированию выполнены автором лично. Эксперименты по флуоресцентному анализу проведены соискателем лично под руководством к.б.н. Петушковой Н.А.

Эксперименты по масс-спектрометрии проведены совместно с к.б.н. Кайшевой А.Л. под руководством д.б.н. Згоды В.Г. Эксперименты по электронной микроскопии проведены совместно с Канашенко С.Л. Разработка программного обеспечения для получения траекторий изменения высоты молекул из АСМ-кадров проведена совместно с Крохиным Н.В. Эксперименты по фотонно-корреляционной спектроскопии проведены совместно с к.ф.-м.н. Медведевой Н.В.

Планирование всех экспериментов, анализ и интерпретация экспериментальных данных, формулировка теоретических положений выполнены Бухариной Н.С. лично под руководством д.б.н., профессора Иванова Ю.Д.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них 4 статьи, 3 из которых – в ведущих журналах, включенных в перечень ВАК Минобрнауки России.

**Структура и объем работы.** Диссертация содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 109 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц и 28 рисунков. Список литературы включает 101 источник.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и основные методы исследования

Биологический объект исследований: очищенный цитохром P450 BM3, предоставленный проф. Мунро А.В. (Манчестерский Университет, Великобритания) и д.б.н. Згодой В.Г. (ФГБУ «ИБМХ» РАМН, Москва). Для проведения АСМ-экспериментов BM3 был иммобилизован за счет нековалентной сорбции молекул на АСМ-подложку (свежесколотая слюда, SPI, США). Активность иммобилизованного фермента и фермента в растворе во время проведения экспериментов контролировалась с использованием масс-спектрометрического анализа.

### **АСМ-визуализация молекул BM3 и определение его олигомерного состояния.**

*Методика АСМ-визуализации BM3 стандартным и сверхтонким зондами.* АСМ-измерения были проведены в полуконтактном режиме на мультимодовом АСМ NTEGRA Aura (НТ-МДТ, Россия) и на АСМ Dimension 3100 (Bruker, США). Среда измерений: жидкость (2,5 мМ PBS, pH 7,4, 22°C), воздух (RH ~ 60%, 22°C) и вакуум ( $10^{-2}$  Торр, 22°C). Скорость сканирования 1÷3 Гц. В каждом эксперименте было получено не менее 10 кадров, каждый эксперимент был проведен не менее 3 раз. В работе были использованы следующие АСМ-зонды. Для измерений в жидкости - DNP-S10 (радиус кривизны ( $r$ ) 10–20 нм, жесткость 0,32–0,58 Н/м, Bruker, США). Для измерений в воздухе и в вакууме - стандартные зонды NSG10 ( $r \sim 10$ –15 нм, жесткость  $\sim 12$  Н/м, НТ-МДТ, Россия) и PPP-NCH ( $r \sim 10$  нм, жесткость  $\sim 42$  Н/м, Nanosensors, Швейцария), а также сверхтонкие зонды NSG01\_DLC ( $r \sim 1$ –3 нм, жесткость 2,5–10 Н/м, НТ-МДТ, Россия). Радиус кривизны АСМ-зондов контролировался на электронном микроскопе Hitachi 5500 (Япония).

*Обработка АСМ-изображений.* Распределения АСМ-изображений визуализированных объектов по высотам и объемам были получены при помощи программы «AFMdtpr» (ФГБУ «ИБМХ» РАМН). Высоты белковых молекул BM3 определялись как высоты соответствующих максимумов распределения  $\rho(h)$  их изображений по размерам по соотношению:

$$\rho(h) = \frac{N_h}{N} * 100\% \quad (1),$$

где  $N_h$  – это число визуализированных объектов с высотой  $h$ , а  $N$  – это общее число визуализированных объектов. Аппроксимация экспериментальной зависимости (2) проводилась с помощью функции Гауссиана:

$$\rho(h) = \sum \rho_i(h) = \sum_{i=1}^2 \frac{A e^{-4 \ln(2)(h-h_c)^2/w^2}}{w \sqrt{\pi/4 \ln(2)}} \quad (2),$$

где  $A$ ,  $h_c$ ,  $w$  – варьируемые при аппроксимации параметры. В этом случае положение максимума распределения объектов по высотам рассчитывалось как максимум аппроксимирующей функции (2) для каждого распределения. Анализ аппроксимации экспериментальных распределений  $\rho(h)$  основан на критерии  $\chi^2$ . Если эта кривая хорошо аппроксимировалась одной экспонентой, то  $i=1$ , в другом случае кривая аппроксимировалась суммой двух экспонент, а полученные АСМ-изображения визуализированных объектов разделялись на две группы с соответствующими максимумами  $h_{max1}$  и  $h_{max2}$ . Для анализа размеров изображений ВМЗ, полученных сверхтонким зондом, использовалось распределение по высотам и объемам  $\rho(h, V)$ , аналогичное (1).

### **АСМ-мониторинг амплитуды колебаний высоты отдельных молекул ВМЗ.**

АСМ-мониторинг проводился на разных стадиях каталитического цикла фермента. Для измерений был использован АСМ Dimension 3100 (Bruker, США) с жидкостной ячейкой ( $V=4$  мл). Температура в ячейке устанавливалась в диапазоне от 16 до 26°C и контролировалась термопарой (точность измерений 0,1 °C). АСМ-эксперимент с полным каталитическим циклом для каждого значения температуры был повторен не менее 2 раз.

Колебания высоты отдельных молекул ВМЗ регистрировались на каждом этапе каталитического цикла фермента в процессе гидроксирования лауриновой кислоты с использованием адаптированного метода, описанного в работе (Radmacher M. et al., 1994). АСМ-измерения проводились на следующих последовательных этапах каталитического цикла: (1) в буфере (2,5 мМ PBS pH 7,4); (2) в присутствии субстрата (500 мкМ); (3) в присутствии донора электронов NADPH (200 мкМ); (4) в присутствии ингибитора фермента 1-фенилимидазола

(5 мМ). Измерения на 2-4 этапах проводились через 5-10 мин после добавления раствора соответствующего компонента каталитической системы. Эта временная задержка необходима для установления стабильного режима АСМ-измерений после гидродинамического возмущения среды при добавлении раствора и перемешивания.

На каждом этапе проводилась регистрация АСМ-изображений не менее 10 разных молекул фермента. Во время АСМ-регистрации сканирование по медленной оси  $Oy$  было отключено. Таким образом, для каждой визуализированной молекулы было получено изображение в виде «сечений» (рисунок 1 А), то есть регистрировалась временная развертка одной линии сечения топографического изображения. Полученные сечения обрабатывались в программе «RMS-IBMC» (ФГБУ «ИБМХ» РАН). Из изображения сечений отдельной молекулы ВМЗ определялась траектория колебаний максимума высоты этой молекулы от времени  $h_{max}(t)$ . Для сравнительного анализа траекторий разных молекул была проведена их линейная аппроксимация. Используя результат такого действия (рисунок 1 Б), вычислялась  $A_{BM3}$ , амплитуда колебаний высоты для отдельной молекулы ВМЗ за промежутки времени  $\Delta t$ :

$$A_{BM3} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\Delta h_i)^2}{n}} \quad (3),$$

где  $\Delta h_i$  – колебание высоты в  $i$ -й момент времени,  $n$  – число точек на траектории. Значение  $\Delta t$  составляло от 15 до 30 с. Среднее значение амплитуды колебаний молекул ВМЗ  $\bar{A}_{BM3}$  оценивалось усреднением значений  $A_{BM3}$  отдельных молекул. Разностная величина  $\Delta \bar{A}$  средних значений амплитуды колебаний активного фермента ( $\bar{A}_{BM3}^{active}$ , 3 этап) и неактивного фермента ( $\bar{A}_{BM3}^{resting}$ , 2 этап) оценивалась как:

$$\Delta \bar{A}_{BM3} = \bar{A}_{BM3}^{active} - \bar{A}_{BM3}^{resting} \quad (4).$$

Значение  $\Delta A_{BM3}$  для единичной молекулы оценивалось аналогично:  $\Delta A_{BM3} = A_{BM3}^{active} - \bar{A}_{BM3}^{resting}$ .

Для определения уровня шума на каждом этапе АСМ-измерений регистрировался сигнал от участка поверхности АСМ-подложки, не содержащего

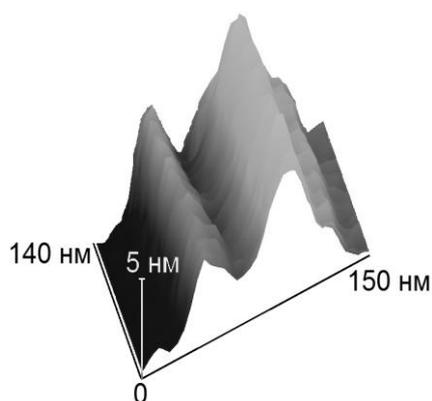
иммобилизованные объекты. Таким образом, в каждом кадре определялось значение колебаний поверхности слюды  $A_{mica}$ , которые впоследствии усреднялись –  $\bar{A}_{mica}$  – для данного этапа каталитического цикла. В случае объективно высоких значений  $A_{mica}$  такой кадр исключался из дальнейшего рассмотрения.

Погрешность измерений  $\sigma$  для средних значений амплитуды колебаний высоты оценивалась в виде 95%-го доверительного интервала:

$$\sigma = \pm t \sqrt{\sum_i \Delta_i^2 / (n(n-1))}, \text{ где } \Delta_i \text{ – отклонение результата каждого опыта от}$$

среднего значения,  $n$  – число опытов в серии,  $t$  – коэффициент Стьюдента.

А



Б

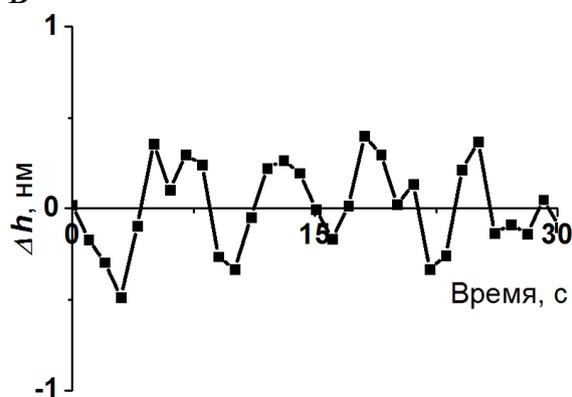


Рисунок 1 – Трехмерное АСМ-изображение сечения молекул (А) и пример зависимости колебаний высоты молекулы ВМЗ после проведения линейной аппроксимации исходной траектории  $h_{max}(t)$  (Б). Время наблюдения за данной молекулой  $\Delta t = 30$  с; количество точек на траектории  $n = 31$  точка; амплитуда колебаний молекулы, вычисленная по формуле (4),  $A_{ВМЗ} = 2,4 \text{ \AA}$ .

### АСМ-исследование температурной денатурации ВМЗ.

*Методика АСМ-мониторинга конфигурации иммобилизованного фермента при различных температурах.* Растворы белка для иммобилизации, АСМ-подложка и промывочный буфер предварительно термостатировались при заданной температуре  $T^{\circ}\text{C}$  (10, 17, 22, 30, 35, 48, 56,  $60^{\circ}\text{C}$ ) следующим образом: раствор белка и буфер выдерживались в термошейкере (20 мин, Thermomixer comfort, Eppendorf); АСМ-подложка выдерживалась в термошейкере (для  $17^{\circ}\text{C} \leq T \leq 60^{\circ}\text{C}$ , 20мин, Thermoshake Gerhardt) или (только для  $T=10^{\circ}\text{C}$ ) в холодильнике (Атлант, Белоруссия). АСМ-измерения в жидкости проводились

для образцов, приготовленных и визуализированных при 10, 17, 22, 30°C. Для этих исследований образцы готовились следующим образом. Раствор белка (4 мкл, 0,18 мкМ, 10 мМ PBS, pH 7,4, T°C) наносился на поверхность АСМ-чипа и инкубировался (3 мин, T°C). Далее поверхность АСМ-подложки промывалась буфером (10 мМ PBS, pH 7,4, T°C). Влажная АСМ-подложка с белком сразу помещалась в термостатируемую жидкостную ячейку АСМ, содержащую буфер (2,5 мМ PBS, pH 7,4, T°C). АСМ-сканирование проводилось на АСМ NTEGRA Vita (НТ-МДТ, Россия) с использованием зондов DNP-S10.

АСМ-измерения в воздухе проводились в двух сериях экспериментов. В первой группе экспериментов (серия 1, «нагретые в растворе») исследовались образцы белка, приготовленные и выдержанные в растворе при заданной температуре T°C (30, 35, 48, 56, 60°C) в течение 20 мин, после чего проводилась иммобилизация на поверхности АСМ-чипа, визуализация в воздухе при 22°C. Во второй экспериментальной серии (серия 2, «нагретые на подложке») исследовались образцы раствора белка, приготовленные и иммобилизованные на АСМ-чип при 10°C, но далее АСМ-чип с иммобилизованным белком нагревался в воздухе на термостойке SU045NTF (НТ-МДТ, Россия) при заданной температуре T°C в течение 20 мин, после чего проводилась АСМ-визуализация при 22°C.

Для всех измерений в воздухе ВМЗ был иммобилизован на АСМ-подложку следующим образом. Раствор белка (2 мкл, 0,5 мкМ, 10 мМ PBS, pH 7,4, T°C) наносился на поверхность АСМ-чипа и инкубировался (3 мин, T°C). Далее поверхность АСМ-подложки промывалась деионизованной водой (T°C) и высушивалась в потоке азота. Сканирование в воздухе проводилось по описанной выше методике.

*Флуоресцентный анализ.* Спектры флуоресценции растворов ВМЗ были получены на флуоресцентном спектрометре LS55 (Perkin Elmer, США,  $\lambda$  возбуждения 280 нм,  $\lambda$  излучения – 290-600 нм, ширина щелей 4,5 нм). Измерения проводились в кварцевой кювете (L=1 см, V=3 мл, C(ВМЗ)= $10^{-7}$ М, 10 мМ PBS). Температура в кювете поддерживалась с помощью термостата Haake DC1 (Fisons Scientific Equipment, Великобритания). Измерения проводились через 2 мин после достижения заданной температуры в термостате. Спектры были сняты в

следующем температурном диапазоне: от 10°C до 40°C с шагом 2°C, от 40°C до 60°C с шагом 5°C. Для каждой заданной температуры на спектре флуоресценции был найден максимум в диапазонах 320-360 нм и 520-550 нм, что соответствует излучению ароматических и флавиновых хромофорных групп ВМЗ, соответственно.

### Результаты исследования и их обсуждение

#### **АСМ-визуализация ВМЗ и определение его олигомерного состояния.**

Визуализация ВМЗ, иммобилизованного на АСМ-подложке, была проведена в трех различных средах (в жидкости, в воздухе и в вакууме) с использованием зондов двух типов: стандартного (радиус кривизны ~10 нм) и сверхтонкого (радиус кривизны ~2 нм).

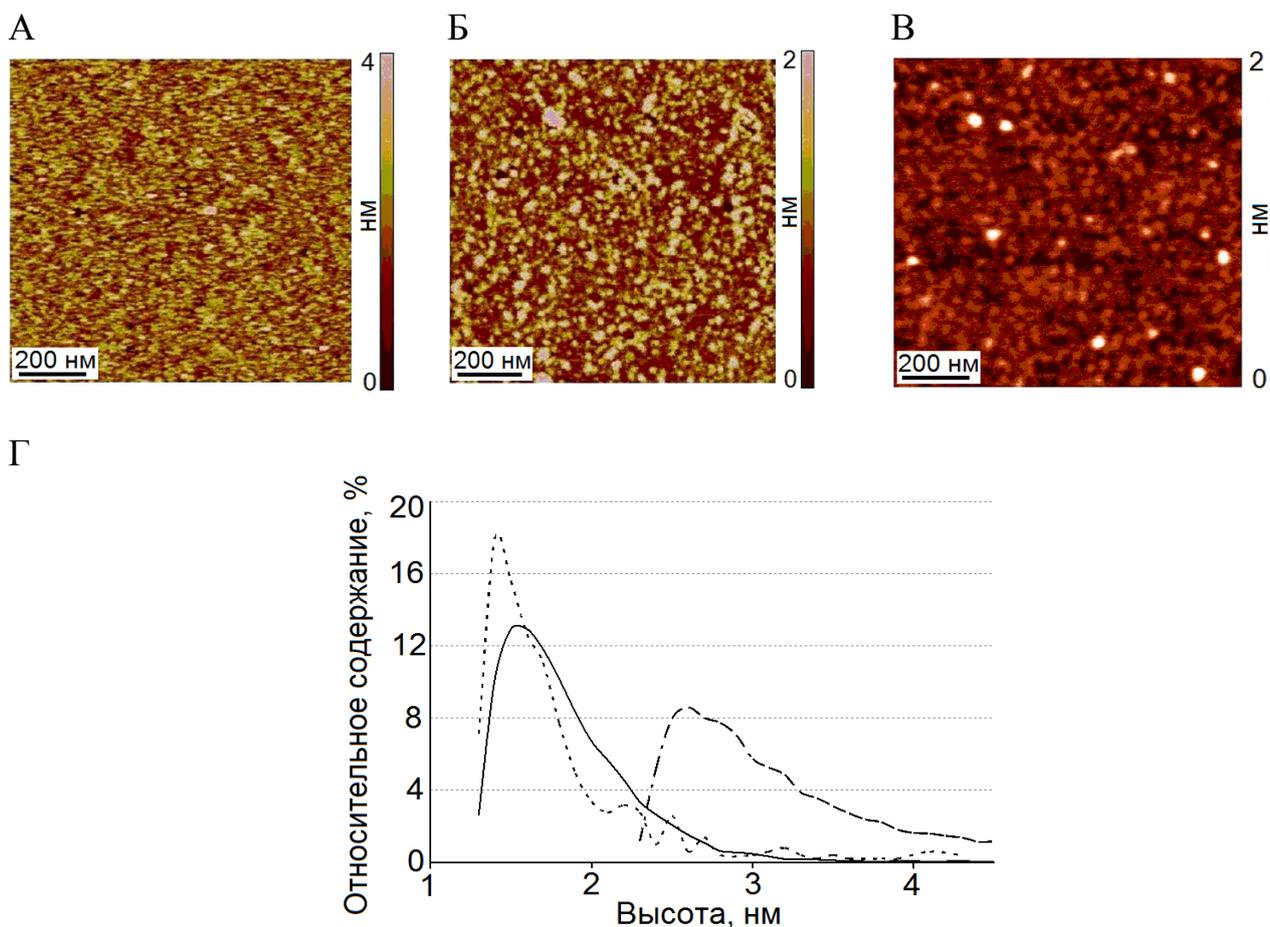


Рисунок 2 – АСМ-изображения иммобилизованного ВМЗ, полученные стандартными зондами в буфере (А), в воздухе (Б) и в вакууме (В), и  $\rho(h)$  (Г), полученные в результате обработки данных измерений в буфере (— · — · —), в воздухе (—) и в вакууме (- - - -).

Примеры полученных изображений и результаты обработки данных представлены на рисунке 2 А-Г. Результаты аппроксимации  $\rho(h)$  представлены в таблице 1. На основе полученных данных было сделано предположение, что распределение первого типа  $\rho_1(h)$  ( $h_{max1}=2,7\pm0,1$  нм) соответствует распределению изображений мономеров ВМЗ по высотам, а второе  $\rho_2(h)$  ( $h_{max2}=3,5\pm0,3$  нм) - распределению олигомеров. Таким образом, было показано, что молекулы белка в растворе находятся, как в виде мономеров, так и в виде олигомеров, что согласуется с литературными данными. Также обнаружено, что высоты мономеров белка, измеренные в воздухе и в вакууме, совпадают в пределах погрешности. Это может свидетельствовать о стабильности структуры белка в этих условиях измерений.

Таблица 1 – Значения максимума высоты визуализированных объектов  $h_{max}$ , вычисленные по кривым аппроксимации  $\rho(h)$  АСМ-изображений ВМЗ, полученных стандартным зондом.

Экспериментальные условия	Объекты	$h_{max}$ , нм	Доля объектов, %
Буфер	Мономеры	$2,7\pm0,1$	$50\pm10$
	Олигомеры	$3,5\pm0,3$	$50\pm10$
Воздух	Мономеры	$1,5\pm0,1$	$40\pm10$
	Олигомеры	$1,9\pm0,1$	$60\pm10$
Вакуум	Мономеры	$1,5\pm0,1$	$70\pm10$
	Олигомеры	$2,1\pm0,1$	$30\pm10$

Информация о степени олигомеризации белка была получена в экспериментах с использованием *сверхтонких зондов* при измерениях в воздухе и в вакууме. Примеры полученных изображений и результаты обработки данных представлены на рисунке 3 А-Г. Использование сверхтонких зондов повысило латеральное разрешение изображений белка и позволило рассчитать объемы объектов, соответствующих разным олигомерным состояниям белка (таблица 2).

Из таблицы 2 видно, что в пределах погрешности значения высот объектов в воздухе и в вакууме совпадают. В то же время объекты, соответствующие распределениям по высотам и объемам  $\rho(h, V)$ , могут быть разделены на 4 группы: 1) объекты с минимальным объемом соответствующие мономерам; 2) с удвоенным объемом – димерам; 3) с утроенным объемом – тримерам и 4) с большими объемами – агрегатам более высокого порядка. Доля объектов, отнесенных к молекулам белка различной степени олигомеризации, также приведена в таблице 2. Доля мономеров, определенная при измерениях сверхтонким зондом в воздухе, составила  $\approx 86 \pm 10\%$ , тогда как в вакууме –  $53 \pm 11\%$ . Это явление может быть связано с повышением силы воздействия зонда на молекулы белка при переходе из воздушной среды измерений в вакуумную. Действительно, оценка значения этой силы показала, что при условии одинаковых амплитуд свободных и вынужденных колебаний, величина силы на порядок больше в воздухе, чем в вакууме, что может приводить к разбиванию олигомеров на мономеры.

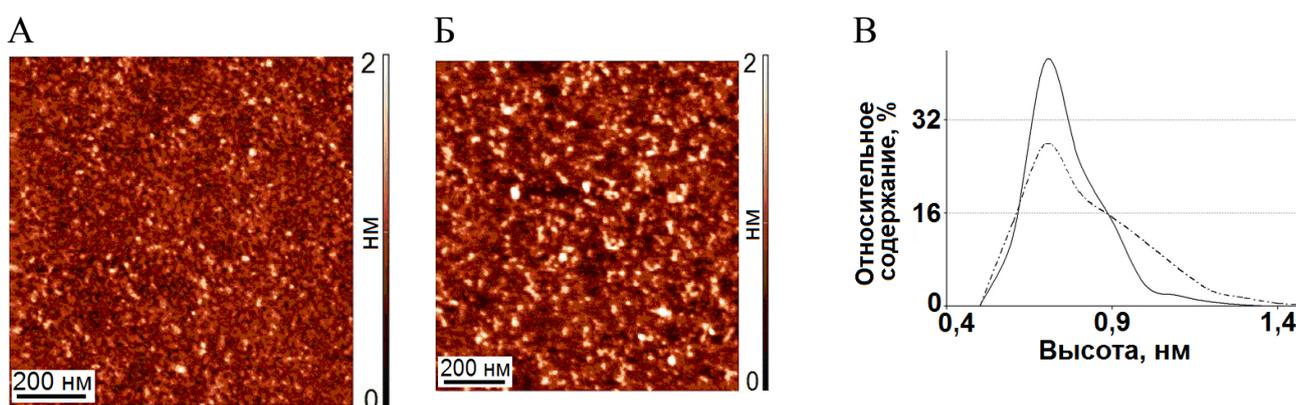


Рисунок 3 – АСМ-изображения иммобилизованного ВМЗ, полученные сверхтонкими зондами в воздухе (А) и в вакууме (Б) и  $\rho(h)$  (Г), полученные в результате обработки данных измерений в воздухе (—) и в вакууме (---)

Таблица 2 – Значения максимума высоты  $h_{max}$  и соответствующие объемы  $V$ , вычисленные по кривым аппроксимации  $\rho(h, V)$  АСМ-изображений ВМЗ, полученных сверхтонким зондом в воздухе и в вакууме.

Среда измерений	Объекты	Объем, нм <sup>3</sup>	$h_{max}$ , нм	Доля объектов, %
воздух	Мономеры	50±10	0,7±0,1	86±10
	Димеры	100±10	0,9±0,1	10±2
	Тримеры	150±20	1,0±0,1	4±1
вакуум	Мономеры	50±10	0,7±0,1	53±11
	Димеры	100±10	0,9±0,1	27±5
	Тримеры	150±20	1,0±0,1	13±3
	Агрегаты более высокого порядка	200±20	1,0±0,1	7±1

### Мониторинг активности единичных молекул ВМЗ с использованием АСМ.

АСМ-мониторинг колебаний высоты единичных молекул ВМЗ был проведен в процессе реакции гидроксирования лауриновой кислоты.

В результате АСМ-мониторинга колебаний высоты ВМЗ, когда фермент неактивен, на 1 этапе каталитического цикла было визуализировано 11 молекул, на 2 этапе после добавления субстрата – 17 молекул. Диапазон высот визуализированных молекул ВМЗ составил 1,3÷6,5 нм, то есть среди них находились как мономеры ( $h_{max1}=2,7±0,1$  нм), так и олигомеры ( $h_{max2}=3,5±0,3$  нм). На рисунке 4 представлены характерные временные зависимости колебаний высоты молекулы белка, иммобилизованного на слюде, и самой слюды, полученные на 1 и 2 этапах, из которого видно, что траектории колебаний высоты сравнимы для молекулы ВМЗ и слюды. По формуле (3) были вычислены значения амплитуд колебаний высоты для отдельных молекул и для слюды. В таблице 3 представлены значения *усредненных* амплитуд колебаний высоты отдельных молекул  $\bar{A}_{ВМЗ}$  и усредненного шума от слюды  $\bar{A}_{mica}$  на этих этапах. Следует также отметить, что зависимости между высотой молекулы и амплитудой колебаний ее

высоты не наблюдалось (коэффициент корреляции равен 0,1), а значения амплитуд колебаний высоты отдельных молекул  $A_{\text{ВМЗ}}$  были сравнимы со значениями усредненного шума от слюды  $\bar{A}_{\text{mica}}$  на этих этапах ( $A_{\text{ВМЗ}} \leq 0,28$  нм). Таким образом, добавление субстрата не влияло на величину колебания высоты молекулы.

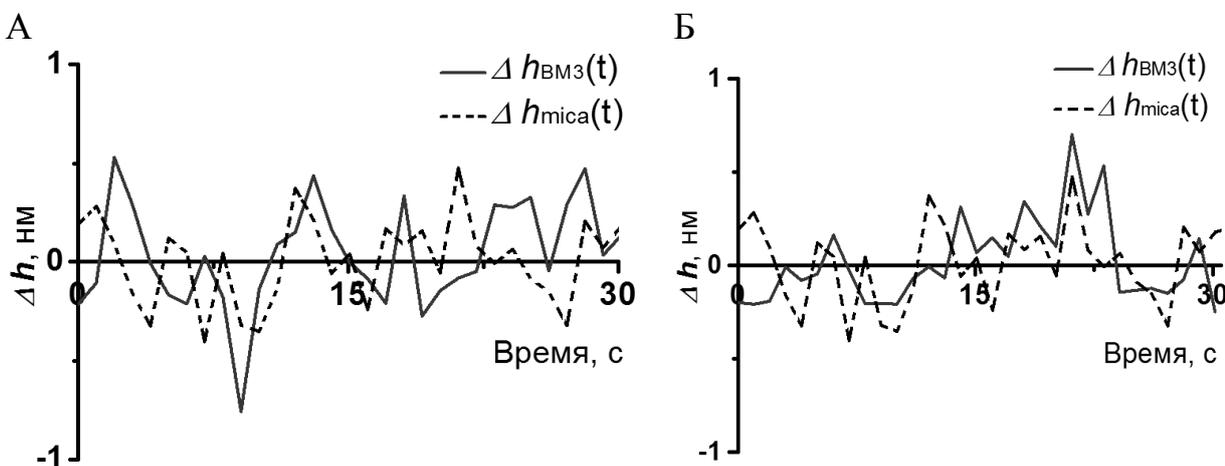


Рисунок 4 – Пример характерных траекторий колебаний высоты, полученных на 1 этапе АСМ-мониторинга активности ВМЗ в буфере (А) и на 2 этапе в присутствии субстрата лауриновой кислоты (Б).

(—) – траектория для молекулы фермента ВМЗ  $\Delta h_{\text{ВМЗ}}(t)$ , (---) – траектория для слюды  $\Delta h_{\text{mica}}(t)$ . Высота молекулы белка в обоих случаях составляла  $(2,3 \pm 0,1)$  нм.

Таблица 3 – Среднее значение амплитуды колебаний высоты отдельных молекул  $\bar{A}_{\text{ВМЗ}}$  и среднее значение шума от слюды  $\bar{A}_{\text{mica}}$  на разных этапах каталитического цикла ВМЗ.

Этапы АСМ-мониторинга	$\bar{A}_{\text{ВМЗ}} \pm \sigma$ , нм	$\bar{A}_{\text{mica}} \pm \sigma$ , нм
1 этап, буфер	$0,25 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,03$
2 этап, +субстрат	$0,25 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,03$
3 этап, +NADPH	$0,36 \pm 0,02$ (42% активных)	$0,23 \pm 0,03$
4 этап, +ингибитор	$0,21 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,03$

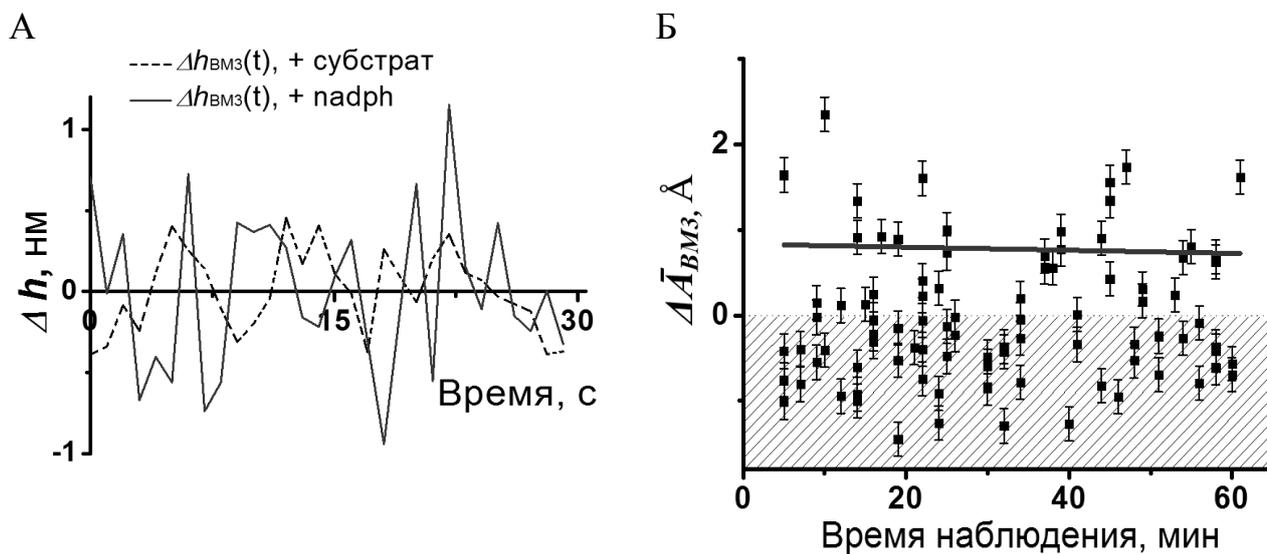


Рисунок 5 – Результаты АСМ-мониторинга колебаний высоты молекулы VM3 на 2 и 3 этапах каталитического цикла.

А) (—) – траектория для молекулы фермента VM3  $\Delta h_{VM3}(t)$  в присутствии NADPH, (---) –  $\Delta h_{VM3}(t)$  в присутствии лауриновой кислоты до добавления NADPH. Высота молекулы белка ( $3,8 \pm 0,1$ ) нм.

Б) Соотнесение значений  $\Delta \bar{A}_{VM3}$  отдельных молекул VM3 и времени, прошедшего с момента добавления NADPH, то есть старта реакции гидроксирования. Заштрихованная область – область неактивных молекул VM3. (—) – линия тренда, проведенная через активные молекулы.

После добавления донора электронов NADPH запускается каталитическая реакция гидроксирования лауриновой кислоты. На рисунке 5 А приведен пример траектории колебаний высоты отдельной молекулы на 3 этапе АСМ-мониторинга. Видно, что после добавления NADPH наблюдаемые колебания выше уровня колебаний до добавления NADPH, то есть при каталитической реакции амплитуда колебаний отдельных молекул фермента возрастает.

В таблице 3 представлено среднее значение амплитуды колебаний высоты  $\bar{A}_{VM3}$  на 3 этапе, которое составило ( $0,36 \pm 0,02$ ) нм. Такое значение было получено для 42% из 90 визуализированных и обработанных молекул. Эти молекулы были условно названы «активными». Для активных молекул значения  $A_{VM3}^{active}$  были выше, чем верхняя граница значений  $\bar{A}_{VM3}^{resting}$  на 2 этапе ( $0,25 + 0,03 = 0,28$  нм). Таким образом, наблюдалась *статическая гетерогенность*, когда отдельные

молекулы имеют различную активационную энергию для старта каталитической реакции.

На 4 этапе АСМ-мониторинга после добавления ингибитора амплитуда колебаний высоты молекул ВМЗ уменьшалась до исходного значения 1-го и 2-го этапов. Рассчитанное среднее значение в этом случае также представлено в таблице 4.

Таким образом, значение изменения амплитуды колебаний высоты составило:  $\Delta\bar{A}_{\text{ВМЗ}} = \bar{A}_{\text{ВМЗ}}^{\text{active}} - \bar{A}_{\text{ВМЗ}}^{\text{resting}} \sim (1,1 \pm 0,4) \text{ \AA}$ . Эта величина может служить мерой активности единичных молекул ВМЗ. На рисунке 5 Б представлена зависимость  $\Delta\bar{A}_{\text{ВМЗ}}$  от времени наблюдения. Каждая точка на зависимости соответствует отдельной молекуле. Видно, что на протяжении всего времени наблюдения (~60 мин) визуализируются активные молекулы.

Согласно литературным данным  $k_{\text{cat}}$  для мономеров в 5 раз меньше, чем  $k_{\text{cat}}$  олигомеров (Neeli R. et al., 2005). Поэтому АСМ-данные мониторинга колебаний высоты молекулы ВМЗ были разделены на 2 группы: данные для объектов с высотой <2,2 нм (мономеры) и для объектов с высотой >3,5 нм (олигомеры). В каждой группе были выделены активные молекулы и найдены значения  $\Delta\bar{A}_{\text{ВМЗ}}$ , которые представлены в таблице 4. Как видно из таблицы, на основании полученных данных можно сделать вывод, что вероятность обнаружить активный олигомер выше, чем активный мономер.

Таблица 4 – Результаты АСМ-мониторинга колебаний высоты молекулы ВМЗ для мономеров и олигомеров.

Объекты	Число объектов	$\Delta\bar{A}_{\text{ВМЗ}} \pm \sigma, \text{ \AA}$	Доля активных в своей группе объектов, %	Доля активных относительно всех объектов, %
Олигомеры	50	1,2±0,3	52	31
Мономеры	40	1,1±0,4	27	11

Известно, что активность ВМЗ зависит от температуры (Maurer S.C. et al., 2003; Munro A.W. et al., 1996). Зависимость активности иммобилизованного в геле белка от температуры имеет куполообразную форму с максимумом при 25°C (Maurer S.C. et al., 2003). В нашей работе мы также провели измерения амплитуды колебаний высоты белка от температуры. Зависимость изменения амплитуды колебаний высоты ВМЗ  $\Delta\bar{A}_{ВМЗ}$  от температуры представлена на рисунке 6, на котором видно, что наблюдается максимум средней величины амплитуды колебаний молекулы при 22°C.

Таким образом, при катализе, проходящем при участии ВМЗ, наблюдается не только повышение средней амплитуды колебаний его высоты, но и ее зависимость от температуры. Поэтому изменение амплитуды колебаний  $\Delta\bar{A}_{ВМЗ}$  можно принять за параметр активности, тогда:

$$k_{cat}^{AFM} = B * \Delta\bar{A}_{ВМЗ}(t) \quad (5),$$

где  $B$  – коэффициент пропорциональности, а  $t$  – время наблюдения за единичной молекулой.

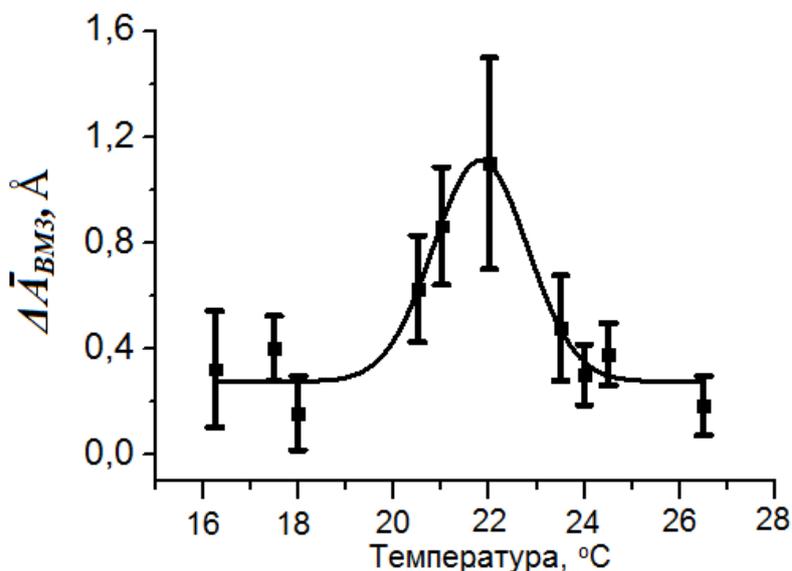


Рисунок 6 - Зависимость изменения амплитуды колебаний высоты ВМЗ  $\Delta\bar{A}_{ВМЗ}$  от температуры.

На рисунке 7 А приведена траектория колебаний высоты отдельной активной молекулы. Серым цветом выделена область колебания высоты неактивных молекул; стрелкой отмечен момент запуска каталитической реакции, после которого велось наблюдение за одной молекулой ВМЗ. Значения  $\Delta A_{\text{ВМЗ}}$ , вычисленные для каждого временного интервала данной траектории активной молекулы представлены на рисунке 7 Б. В данном случае можно говорить о динамической гетерогенности, когда значение каталитической скорости единичной молекулы не постоянно.

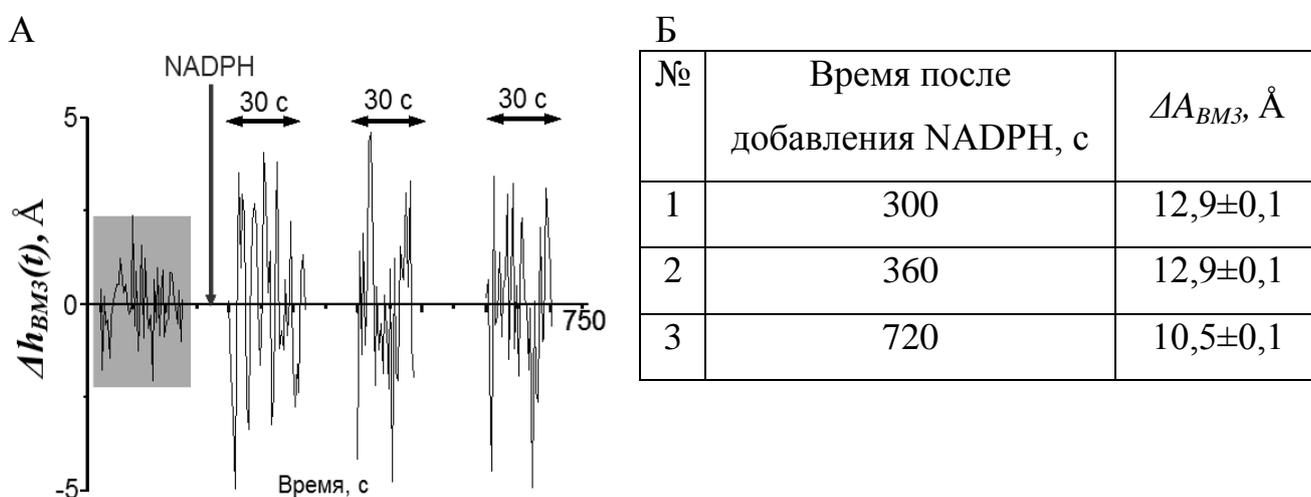


Рисунок 7 - Результаты АСМ-мониторинга колебаний высоты молекулы ВМЗ для отдельной молекулы.

А) Траектории колебаний высоты, полученные на 2 и 3 этапе АСМ-мониторинга активности ВМЗ, то есть до и после добавления NADPH, соответственно. Серым блоком выделена область колебания высоты неактивных молекул. Б) Таблица значений  $\Delta A_{\text{ВМЗ}}$ , вычисленных из этой траектории на трех интервалах длительностью 30 с.

## **Исследование температурной денатурации ВМЗ методами АСМ и флуоресцентного анализа.**

Влияние температуры на активность фермента и температурная денатурация белков широко исследуются для выяснения механизмов функционирования ферментов. В настоящей работе предложен подход для изучения взаимоотношения температурной зависимости активности ВМЗ и температурной денатурации в диапазоне от 10 до 60°C на основе методов АСМ и флуоресцентного анализа. Этот подход включал АСМ-мониторинг плавления ВМЗ и исследование его агрегации в процессе температурной денатурации.

Проведенный флуоресцентный анализ выявил три характерные зоны плавления: 1) 10-33°C, 2) 33-46°C, 3) 46-60°C (рисунок 8). При увеличении температуры от 10 до 33°C наблюдался спад интенсивности флуоресценции в области ароматических групп и ее синхронный рост в области флавиновых групп. Температурная зависимость интенсивности флуоресценции в этом диапазоне имеет форму последовательности из 3-х узких S-образных кооперативных переходов как для одного типа групп, так и для другого. Наличие этих переходов может быть обусловлено последовательностью трех кооперативных понижений гидрофобности микроокружения хромофорных групп. При этом АСМ-анализ показал, что эти 3 кооперативных перехода соответствуют изменению степени олигомеризации ВМЗ.

При дальнейшем повышении температуры, в диапазоне температур от 33 до 46°C наблюдался широкий S-образный переход для кривых флуоресценции как ароматических, так и флавиновых групп. В этом диапазоне, согласно АСМ-данным, наблюдается изменение свойств ВМЗ: на подложке были визуализированы не только компактные олигомеры ( $d < 50$  нм), но и другие агрегаты с увеличенными более чем в 2 раза латеральными размерами ( $d > 100$  нм).

В третьей температурной области от 46 до 60°C наблюдался спад интенсивности флуоресценции в области ароматических групп, а в области флавиновых групп небольшой ее рост с последующим спадом. По АСМ-данным, в этом диапазоне наблюдалась сильная агрегацией денатурированного белка и увеличение высоты агрегатов до 10-15 нм, а латеральных размеров до 150-280 нм.

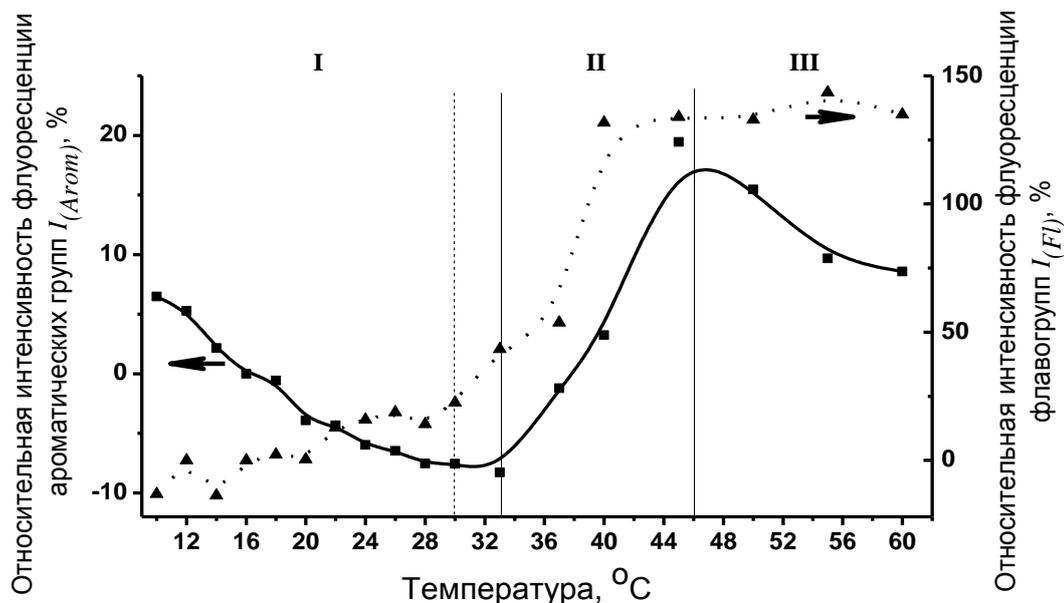


Рисунок 8 - Температурные зависимости интенсивности флуоресценции VM3 для двух максимумов поглощения: (—■—,  $I_{(Arom)}$ ) - при 340-350 нм, что соответствует ароматическим группам, и (-▲-,  $I_{(Fl)}$ ) - при 520-540 нм, что соответствует флавогруппам. Интенсивность флуоресценции при 16°C была принята за ноль, относительно которого были вычислены относительные интенсивности флуоресценции при других температурах. Экспериментальные условия:  $10^{-7}$ М раствор VM3 в 10 мМ PBSD буфере pH 7,4.

## ВЫВОДЫ

1. Проведена АСМ-визуализация нековалентно иммобилизованного фермента ВМЗ в трех различных средах: жидкости, воздухе и вакууме. С использованием стандартного и сверхтонкого зондов определено его олигомерное состояние. Согласно данным АСМ-измерений с высоким латеральным разрешением установлено, что соотношение мономеров, димеров, тримеров и олигомеров более высокого порядка соответствует величине  $\sim 0,5:0,3:0,1:0,1$ .
2. В низкотемпературной области 10-33°C с помощью флуоресцентного анализа было обнаружено 3 кооперативных перехода при плавлении фермента ВМЗ, а с помощью АСМ-анализа продемонстрировано сохранение глобулярной формы молекул ВМЗ при изменении степени олигомеризации в этой температурной области.
3. Проведен мониторинг колебаний высоты отдельных молекул ВМЗ с помощью АСМ (АСМ-мониторинг). Предложена методика определения активности отдельных молекул фермента по оценке средней амплитуды колебаний высоты отдельных молекул ВМЗ на разных стадиях каталитического цикла (при добавлении субстрата, донора электронов, ингибитора), полученной из данных АСМ-мониторинга. Было обнаружено, что разница между средней амплитудой колебаний высоты молекул ВМЗ в активном и неактивном состоянии составила  $(1,1 \pm 0,4) \text{ \AA}$ .
4. Получена температурная зависимость амплитуды колебаний молекул ВМЗ во время каталитического цикла с максимумом при 22°C.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Иванов Ю.Д. АСН-нанотехнологии для визуализации, счета, определения упругости и активности единичных белков цитохром Р450-содержащих монооксигеназных систем. [Текст] / Иванов Ю. Д., **Бухарина Н.С.**, Французов П.А., Плешакова Т.О., Мунро А.В., Хуэй Бон Хоа Г., Арчаков А.И. // Нанотехнологии и охрана здоровья. 2010. №1(2). С.30–35.
2. а) Ivanov Yu.D. Atomic force microscopy visualization and measurement of the activity and physicochemical properties of single monomeric and oligomeric enzymes. [Текст] / Ivanov Yu.D., **Bukharina N.S.**, Pleshakova T.O., Frantsuzov P.A., Krokhin N.V., Ziborov V.S., Archakov A. I. // Biophysics. 2011. V.56(5). P.892–896.  
б) Иванов Ю.Д. АСМ-визуализация, измерение активности и физико-химических свойств единичных мономеров и олигомеров ферментов. [Текст] / Иванов Ю.Д., **Бухарина Н.С.**, Плешакова Т.О., Французов П.А., Крохин Н.В., Зиборов В.С., Арчаков А.И. // Биофизика. 2011. Т.56(5). С.939–944.
3. Ivanov Yu.D. AFM study of cytochrome BM3 oligomeric state. [Текст] / Ivanov Yu.D., **Bukharina N.S.**, Frantsuzov P.A., Pleshakova T.O., Kanashenko S.L., Medvedeva N.V., Argentova V.V., Zgoda V.G., Munro A.W., Archakov A.I. // Soft Matter. 2012. V.8. P.4602–4608.
4. а) Иванов Ю.Д. Определение олигомерного состояния флавоцитохрома BM3 с помощью АСМ со стандартным и сверхтонким зондами. [Текст] / Иванов Ю.Д., **Бухарина Н.С.**, Французов П.А., Плешакова Т.О., Крохин Н.В., Канашенко С.Л., Арчаков А.И. // Биомедицинская химия. 2013. Т.59(4). С.378–387.  
б) Ivanov Yu.D. Oligomeric State Investigation of Flavocytochrome BM3 using AFM with Standard and Supersharpe Probes. [Текст] / Ivanov Yu.D., **Bukharina N.S.**, Frantsuzov P.A., Pleshakova T.O., Krohin N.V., Kanashenko S.L., Archakov A.I. // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2013. V.6(3). P.218–224.
5. **Бухарина Н.С.** Измерение каталитической активности единичных молекул фермента Р450 BM3. [Текст] / **Бухарина Н.С.**, Иванов Ю.Д., Плешакова Т.О.,

- Арчаков А.И. // Труды научной сессии НИЯУ МИФИ-2010. Т.III. «Фундаментальные проблемы науки». Москва. 2010. С.219–220.
6. Иванов Ю.Д. АСМ-мониторинг функционирования единичных молекул ферментов. [Текст] / Иванов Ю.Д., **Бухарина Н.С.**, Плешакова Т.О., Крохин Н.В., Арчаков А.И. // Материалы I международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Москва. 17-19 ноября 2010. С.177.
7. Archakov A.I. Afm-Technology for visualization, counting, measuring the elasticity and activity of the cytochrome P450 monooxygenase proteins. [Текст] / Archakov A.I., **Bukharina N.S.**, Ivanov Yu.D. // 25th International Symposium on Microscale BioSeparations MSB. Prague, Czech. 21-25 марта 2010. P.45–46.
8. **Бухарина Н.С.** Определение активности единичных молекул фермента P450 BM3 с помощью АСМ. [Текст] / **Бухарина Н.С.**, Иванов Ю.Д., Плешакова Т.О., Крохин Н.В., Арчаков А.И. // Сборник тезисов 4-й международной конференции «Современные достижения бионаноскопии». Москва. 15-18 июня 2010. С.18.
9. Иванов Ю.Д. Мониторинг функционирования единичных молекул ферментов с помощью АСМ. [Текст] / Иванов Ю.Д., **Бухарина Н.С.**, Арчаков А.И. // Материалы VI Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Часть 1. Москва. 21-25 марта 2011. С.410.
10. Archakov A.I. Activity and physico-chemical properties of single proteins. [Текст] / Archakov A.I., Ivanov Yu.D., **Bukharina N.S.** // Сборник тезисов. 17th International Conference on Cytochrome P450. Manchester, UK. 26-30 июня 2011. P.30.
11. Ivanov Yu.D. Direct visualization of the physicochemical properties of single protein copy using AFM. [Текст] / Ivanov Yu.D., **Bukharina N.S.**, Archakov A.I. // European Proteomics Association 2012 Scientific Congress. Glasgow, Scotland. 9-12 июля 2012. P.63.

### **Список сокращений**

АСМ – атомно-силовая микроскопия, атомно-силовой микроскоп

PBSD – фосфатно-солевой буфер Дульбекко