

## АСМ-ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ОЛИГОМЕРНОГО СОСТОЯНИЯ ЦИТОХРОМА ВМ3 ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

© 2015 г. Н.С. Бухарина, Ю.Д. Иванов, Т.О. Плешакова, П.А. Французов, Н.Д. Иванова\*, Н.В. Крохин, Н.А. Петушкова, А.И. Арчаков

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10/8;

E-mail: natalie\_buharina@list.ru

\*Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина,  
109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23

Поступила в редакцию 29.05.14 г.

Исследованы тепловая денатурация и агрегация цитохрома P450 ВМ3 с помощью атомно-силового микроскопа. Для определения характерных температурных переходов был использован флуоресцентный анализ. В низкотемпературной области плавления (10–33)°С наблюдался спад интенсивности флуоресценции в области ароматических групп и ее синхронный рост в области флавиновых групп. Плавление в этой области сопровождалось последовательностью из трех узких S-образных кооперативных переходов при температурах 16, 22 и 29°С. С помощью атомно-силовой микроскопии в этой области температур показано сохранение глобулярной формы молекул ВМ3 в виде компактных объектов (высота  $h < 7$  нм, латеральные размеры  $d < 50$  нм) при изменении степени олигомеризации белка: первые два перехода сопровождались уменьшением степени олигомеризации, а третий – увеличением.

*Ключевые слова:* цитохром P450, ВМ3, атомно-силовая микроскопия, кооперативный переход, температурная денатурация.

Флавоцитохром P450 ВМ3 (ВМ3) принадлежит к суперсемейству гемсодержащих ферментов цитохромов P450 и катализирует монооксигенацию жирных кислот [1]. Он представляет собой бактериальный фермент с молекулярной массой 119 кДа [1] и является белком, содержащим редуктазный (FMN/FAD) и гемовый домены в единой полипептидной цепи [2]. Каталитическая активность ВМ3 обусловлена переносом электронов с NADPH-кофактора через редуктазу на гем [3]. При этом ВМ3 формирует димеры, которые проявляют бóльшую активность, чем мономеры [4].

Температурная денатурация фермента и определение влияния температуры на его активность обычно исследуется для выяснения механизма функционирования фермента. В нашей предыдущей работе с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) было показано, что максимум активности единичных молекул ВМ3, нековалентно иммобилизованных на поверхности слюды, наблюдается при температуре 22°С в диапазоне температур (16–28)°С [5]. Авторами работы [6] было обнаружено,

что температурная зависимость каталитической активности ВМ3 имеет колоколообразный вид с максимумом при  $T \approx 25^\circ\text{C}$ , при этом для солюбилизованного белка уменьшение активности при  $T > 25^\circ\text{C}$  более выражено, чем для белка, иммобилизованного в золь-гель-матрице. При этом температуры плавления интактного ВМ3, определенные с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии, составили 48 и 63°С [7]. Низкое по сравнению с температурой плавления значение температуры, соответствующей максимуму активности иммобилизованного ВМ3, может быть связано с нестабильностью электронного транспорта через FMN и FAD на гем, обусловленной возможным изменением структуры и олигомерного состояния фермента под влиянием температуры.

Цель данной работы заключалась в исследовании температурной денатурации ВМ3 в диапазоне температур (10–37)°С. Использованный подход включал в себя мониторинг плавления ВМ3 с помощью флуоресцентного анализа и исследование его олигомерного состояния в процессе температурной денатурации с использованием атомно-силовой микроскопии. АСМ позволяет получать данные о структур-

Сокращение: АСМ – атомно-силовая микроскопия.

ных особенностях белка и о его олигомерном состоянии в условиях, близких к нативным, с субнанометровым разрешением. Точность определения высоты белка с помощью АСМ составляет ~0,1 нм, что сравнимо с разрешением рентгеноструктурного анализа при определении структуры белка [8]. Метод АСМ был ранее использован для визуализации белков цитохром Р450-содержащих систем и их комплексов [9–11], а также для определения олигомерного состояния белков путидаредоксинредуктазы и ВМЗ в различных условиях АСМ-измерений [12,13].

Флуоресцентный анализ был использован для определения характерных температурных переходов на кривой плавления фермента. Внутренними флуорофорами ВМЗ являются остатки ароматических аминокислот – аминокислотные остатки тирозина (Tyr), триптофана (Trp) и фенилаланина (Phe), а также простетические флавиновые группы – FAD и FMN. Наличие таких флуорофоров позволяет использовать метод флуоресцентного анализа для прямого изучения ВМЗ без меток [14,15]. Интенсивность флуоресценции ароматических остатков зависит от диэлектрической константы окружающей их среды, а флуоресценция FAD/FMN возрастает при денатурации флавопротеинов [16,17].

В представленной работе было показано, что наблюдается локальное плавление ВМЗ в низкотемпературной области (10–30)°С, которое влечет изменение степени олигомеризации белка без изменения его глобулярной формы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 10 мМ фосфатно-солевой буфер (PBSD, Pierce, США), pH 7,4, содержащий 8 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 140 мМ NaCl, 10 мМ KCl. Деионизованную ультрачистую воду получали на установке Simplicity UV (Millipore, США).

Цитохром Р450 ВМЗ был любезно предоставлен проф. А.В. Munro (Манчестерский Университет, Великобритания) и В.Г. Згодой (ИБМХ РАМН, Москва, Россия), экспрессирован согласно [4,18]. Концентрацию ВМЗ определяли на спектрофотометре Model 8453 (Agilent, США) при 25°С в соответствии с методом, описанным в работе [19].

**Флуоресцентный анализ.** Спектры флуоресценции растворов ВМЗ были получены на флуоресцентном спектрометре LS55 (Perkin Elmer, США). Длина волны возбуждения составляла 280 нм, а диапазон спектра излучения – 290–600 нм. Спектральные ширины щелей спектрометра составляли 4,5 нм для линий возбуждения и излучения. Измерения проводили в кварцевой

кювете с длиной оптического пути 1 см и объемом 3 мл. Концентрация ВМЗ в PBSD-буфере равнялась  $10^{-7}$  М. Температуру в кювете поддерживали с помощью термостата Haake DC1 (Fisons Scientific Equipment, Великобритания). Измерения проводили через 2 мин после достижения заданной температуры в термостате. Спектры были сняты в температурном диапазоне от 10 до 30°С с шагом 2°С. Также спектры были сняты при температуре 33 и 37°С. Измерения для раствора ВМЗ, нагретого до 33°С, а затем охлажденного до 16°С, так называемый режим «охлаждение после нагревания», проводили следующим образом: после нагревания кювету с раствором белка охлаждали с помощью дополнительной секции водно-ледяной бани, встроенной в термостат.

Экспериментально полученные спектры флуоресценции ВМЗ были аппроксимированы экспоненциальной функцией:

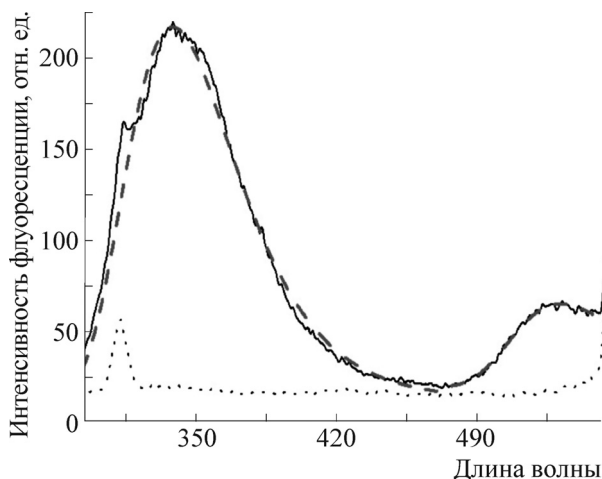
$$y = y_0 + A \exp(-e^{-z}) - z + 1), \quad (1)$$

$$z = (x - x_c)/w.$$

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.

**АСМ-визуализация ВМЗ.** Имобилизация ВМЗ осуществлялась за счет нековалентной адсорбции молекул на АСМ-чипе, в качестве которого использовали свежесколотую слюду (SPI, США). Растворы белка для имобилизации, АСМ-подложку и буфер для промывки предварительно термостатировали при заданной температуре (10, 17, 22, 30°С) следующим образом: раствор белка и буфер выдерживали в термощейкере (20 мин, Thermomixer comfort, Eppendorf); АСМ-подложку выдерживали в термощейкере (для  $17^\circ\text{C} \leq T \leq 30^\circ\text{C}$ , 20 мин, Thermoshake Gerhardt) или (только для 10°С) в холодильнике (Атлант, Белоруссия).

АСМ-измерения проводили в жидкости для образцов, приготовленных и визуализированных при температурах 10, 17, 22, 30°С. Для этих исследований образцы готовились следующим образом. Раствор белка (4 мкл, 0,18 мкМ, 10 мМ PBSD-буфер, pH 7,4) наносили на поверхность АСМ-чипа и инкубировали 3 мин. Далее поверхность АСМ-подложки промывали PBSD-буфером, влажную АСМ-подложку с ВМЗ сразу помещали в термостатируемую жидкостную ячейку АСМ, содержащую 2,5 мМ PBSD-буфер, pH 7,4. АСМ-сканирование про-



**Рис. 1.** Пример спектров флуоресценции ( $\lambda_{\text{ex}} = 280$  нм), полученных при температуре  $22^\circ\text{C}$  в кварцевой кювете: (—) – спектр флуоресценции VM3 и (- - -) – его аппроксимация уравнением (1); (· · ·) – контрольный спектр флуоресценции 10 мМ PBS-D-буфера, pH 7,4 без белка. Экспериментальные условия: VM3 ( $10^{-7}$  М) в 10 мМ PBS-D-буфере, pH 7,4.

водили на атомно-силовом микроскопе NTEGRA Vita (HT-МДТ, Россия) с использованием зондов DNP-S10 (Bruker, США) с константой жесткости 0,32–0,58 Н/м и радиусом кривизны 10–20 нм.

Для АСМ-измерений использовали полу-контактный режим при скорости сканирования  $0,5 \div 1$  Гц. В каждом эксперименте сканировалось не менее 10 кадров, размеры которых по  $X$  и  $Y$  составляли от 0,5 до 5 мкм. Каждый АСМ-эксперимент был проведен не менее трех раз.

В контрольных экспериментах проводили АСМ-визуализацию поверхности слюды после инкубации в воде и соответствующем буфере, не содержащем белок. Размер неспецифических объектов, зарегистрированных на АСМ-подложке, в контрольных экспериментах не превышал  $0,8 \pm 0,1$  нм, а их количество на кадре площадью 25 мкм<sup>2</sup> не превышало пяти объектов.

Обработку АСМ-изображений производили при помощи программного обеспечения для обработки АСМ-данных (ПО «одАСМ», Роспатент, рег. номер № 2010613458, 26 мая 2010 г.), разработанного в ИБМХ. Обычно в растворах белков, несмотря на высокую очистку, присутствуют загрязнения, формирующие пленку на слюде. Высота этой пленки в наших экспериментах составляла в буфере  $2,0 \pm 0,1$  нм. Поэтому данный факт учитывали при обработке АСМ-данных за счет введения уровня отсечения

2,2 нм в буфере. Высоты белковых молекул VM3 определяли как высоты соответствующих максимумов распределения  $\rho(h)$  их изображений по высотам аналогично [12,13]:

$$\rho(h) = \frac{N_h}{N} * 100\%, \quad (2)$$

где  $N_h$  – число визуализированных белков с высотой  $h$ , а  $N$  – общее число визуализированных белков. Аппроксимацию экспериментальной зависимости (2) проводили с помощью функции Гауссиана:

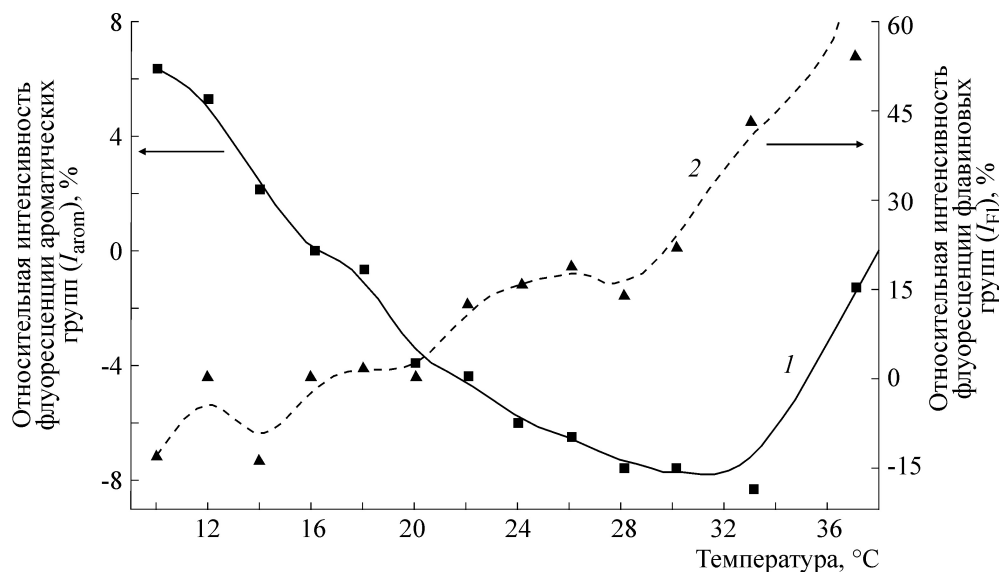
$$\rho(h) = \sum \rho_i(h) = \sum_{i=1}^2 \frac{A e^{-4 \ln(2)(h-h_c)^2/w^2}}{w \sqrt{\pi/4 \ln(2)}} \quad (3)$$

где  $A$ ,  $h_c$ ,  $w$  – варьируемые при аппроксимации параметры. Аппроксимация основывалась на критерии  $\chi^2$ . Если экспериментальная зависимость  $\rho(h)$  неудовлетворительно аппроксимировалась одноэкспоненциальной функцией, то для аппроксимации использовали сумму двух экспонент. В последнем случае АСМ-изображения визуализированных объектов разделяли на две группы с соответствующими максимумами высот  $h_{\text{max}1}$  и  $h_{\text{max}2}$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Флуоресцентный анализ температурной денатурации VM3.** Определение температур переходов при температурной денатурации VM3 проводили с помощью флуоресцентного анализа для диапазона  $(10\text{--}37)^\circ\text{C}$ . VM3 имеет 12 аминокислотных остатков Trp и 35 – Tyr (по известной структуре), в том числе в гемовом домене – 5 остатков Trp [20] и в редуктазном домене – 7 остатков Trp (включая флавиносвязывающий аминокислотный остаток Trp<sup>574</sup> [21]). Поэтому для выяснения влияния температуры на структуру VM3 флуоресцентный анализ проводили как по спектрам флуоресценции ароматических аминокислотных остатков, так и флавиновых групп. Устойчивый сигнал флуоресценции VM3 наблюдали при длине волны возбуждения  $\lambda_{\text{ex}} = 280$  нм в области  $\lambda_{\text{em}} 290\text{--}550$  нм. Вклад в спектр флуоресценции белка в области 320–360 нм вносят ароматические остатки, а в области 500–550 нм – флавиновые группы [17].

Экспериментально полученные спектры флуоресценции VM3 хорошо аппроксимировались с помощью экспоненциальной функции (1). На рис. 1 приведен пример экспериментального и аппроксимированного спектра флуоресценции ароматических и флавиновых групп



**Рис. 2.** Температурные зависимости интенсивности флуоресценции VM3 ароматических и флавиновых групп: 1 – ароматические группы, максимум поглощения находится в диапазоне 340–350 нм; 2 – флавиновые группы, максимум поглощения находится в диапазоне 520–540 нм. Интенсивность флуоресценции при 16°C была принята за ноль, относительно которого были вычислены относительные интенсивности флуоресценции при других температурах. Экспериментальные условия: VM3 ( $10^{-7}$  М) в 10 мМ PBS-D-буфере, pH 7,4.

VM3, полученный при 22°C, а также экспериментальный спектр буфера без белка. Подобным образом были обработаны флуоресцентные спектры, полученные в экспериментах при каждой исследованной температуре в диапазоне (10–37)°C, и определены значения максимумов  $\lambda^{\max}$  в диапазоне 340–350 нм, что соответствует флуоресценции ароматических остатков, и в диапазоне 520–540 нм, что соответствует флуоресценции флавиновых групп. На основе полученных данных флуоресцентного анализа были построены температурные зависимости интенсивности флуоресценции VM3 для двух вышеуказанных диапазонов. Полученные зависимости  $I_{аром} = f(T)$  и  $I_{ФГ} = f(T)$ , где  $I_{аром}$  и  $I_{ФГ}$  – интенсивность флуоресценции ароматических остатков и флавиновых групп VM3 соответственно для  $\lambda^{\max}_{340-350}$  и  $\lambda^{\max}_{520-540}$ , а  $T$  – температура, представлены на рис. 2.

Видно, что при повышении температуры от 10 до 33°C наблюдалось существенное падение интенсивности флуоресценции ароматических остатков VM3 в области (10–30)°C, с переходной областью (30–33)°C, в которой тенденция зависимости меняется на противоположную. При этом падение интенсивности происходило не плавно, а в виде трех последовательных узких S-образных переходов, ширина каждого из которых была порядка 2°C. Найденные путем дифференцирования функции  $I_{аром}(T)$  [22,23] значения точек перегиба  $T_{m(аром)}$  в этих трех

переходах составили  $(16 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,  $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,  $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

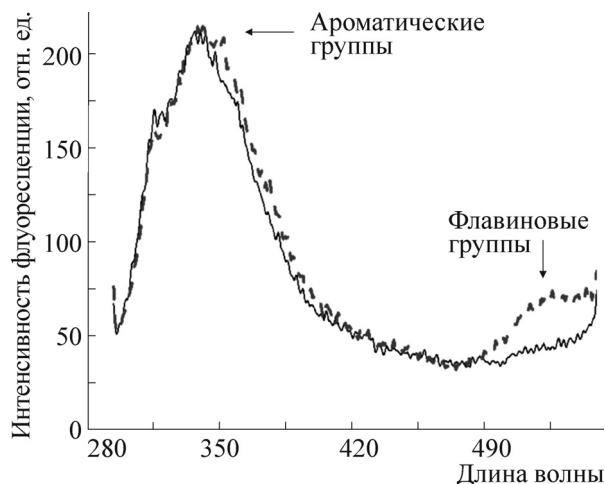
Аналогичный анализ зависимости  $I_{ФГ}(T)$  в этом диапазоне, показал, что при повышении температуры наблюдалось возрастание интенсивности флуоресценции флавиновых групп также в виде трех узких последовательных S-образных переходов ( $\sim 2^\circ\text{C}$ ). Значения точек перегиба  $T_{m(ФГ)}$  функции  $I_{ФГ}(T)$  в этих переходах составили  $(16 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,  $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ , что практически совпадает со значениями точек перегиба, рассчитанными при анализе зависимости  $I_{аром}(T)$ .

Согласно данным флуоресцентного анализа при обратном понижении температуры с 33 до 16°C интенсивность флуоресценции ароматических групп приходила к начальному уровню, тогда как интенсивность флуоресценции флавиновых групп – нет (рис. 3).

При дальнейшем повышении температуры до 37°C наблюдали изменение тренда температурной зависимости интенсивности флуоресценции ароматических групп, тогда как интенсивность флуоресценции флавиновых групп продолжала расти (рис. 2).

**АСМ-анализ влияния температуры на структуру VM3.** АСМ-визуализацию VM3, адсорбированного на АСМ-подложке, проводили в жидкости и на воздухе.

АСМ-измерения VM3 в жидкости проводили для образцов, приготовленных и визуализи-

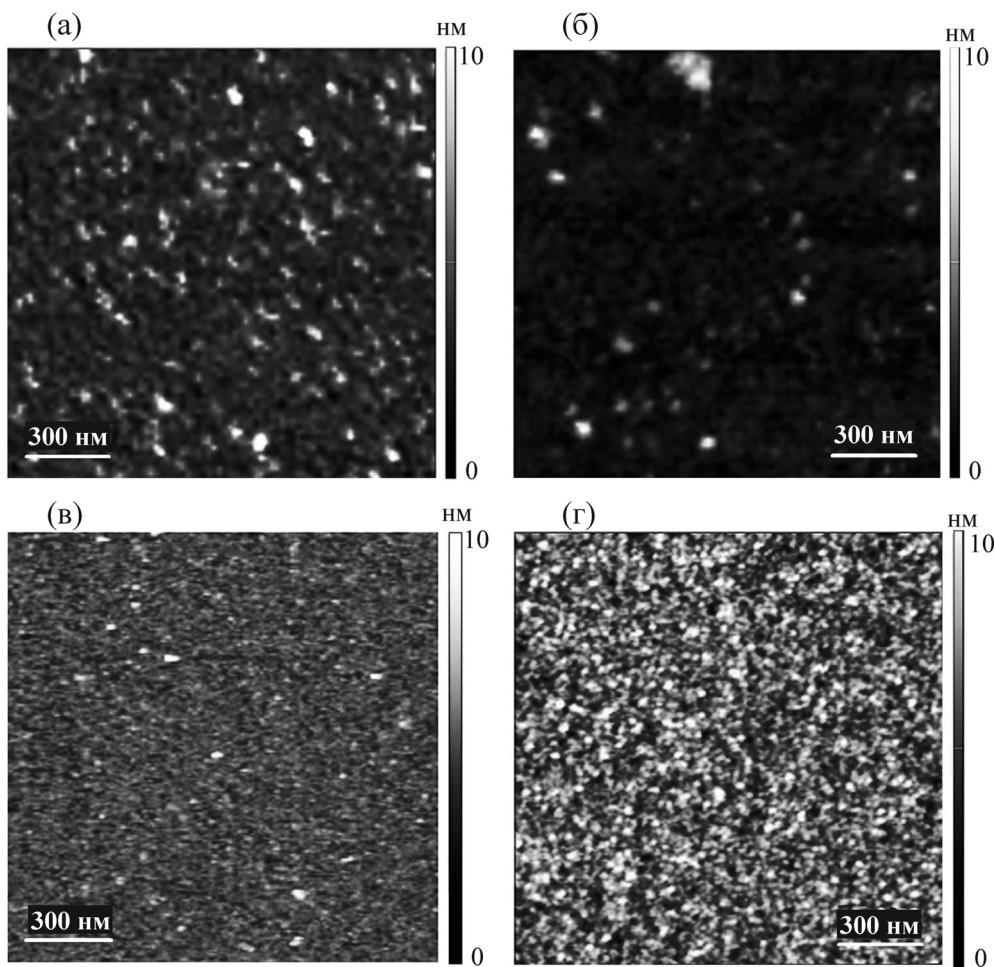


**Рис. 3.** Спектры флуоресценции VM3 ( $\lambda_{\text{ex}} = 280$  нм), полученные в эксперименте «охлаждение после нагревания»: (—) – спектр при 16°C, (---) – спектр после понижения температуры с 33 до 16°C. Экспериментальные условия: VM3 ( $10^{-7}$  М) в 10 мМ PBSD-буфере, pH 7,4.

зированных при температурах 10, 17, 22 и 30°C. Выбор температуры измерений в этих экспериментах обусловлен результатами флуоресцентного анализа: при данных значениях температур наблюдались выходы на плато S-образных переходов зависимостей  $I_{\text{аром}}(T)$  и  $I_{\text{Fl}}(T)$ , описанные в предыдущем разделе.

Примеры полученных АСМ-изображений VM3 представлены на рис. 4. На основе данных АСМ-сканирования были построены распределения изображений по высотам  $\rho(h)$ , соответствующие этим условиям АСМ-измерений (рис. 5). Аппроксимацию экспериментальных зависимостей  $\rho(h)$  проводили с помощью суммы двух экспонент по уравнению (3) (см. «Материалы и методы»).

В таблице приведены результаты обработки АСМ-данных вышеуказанным способом. Представлены значения максимумов высот  $h_{\text{max1}}$  и  $h_{\text{max2}}$  АСМ-изображений VM3, полученные при вышеуказанных температурных режимах, а так-



**Рис. 4.** АСМ-изображения VM3, адсорбированного на слюде. Экспериментальные условия: полуконтактный режим, визуализация в 2,5 мМ PBSD-буфере, pH 7,4, АСМ NTEGRA VITA. Температура иммобилизации равна температуре визуализации (а)  $T = 10^\circ\text{C}$ , (б)  $17^\circ\text{C}$ , (в)  $22^\circ\text{C}$ , (г)  $30^\circ\text{C}$ . (С). Размеры кадров  $1,5 \times 1,5$  мкм.

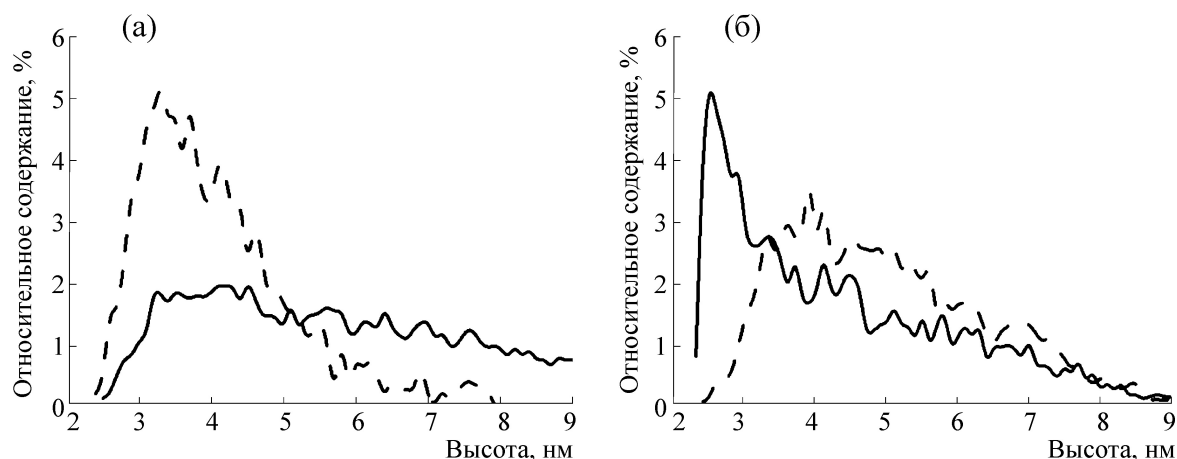


Рис. 5. Плотность распределения АСМ-изображений VM3 по высотам. (а) (—) –  $\rho(h)$  для 10°C, (---) –  $\rho(h)$  для 17°C; (б) (—) –  $\rho(h)$  для 22°C, (---) –  $\rho(h)$  для 30°C.

же вклады групп визуализированных объектов с  $h_{\max 1}$  и  $h_{\max 2}$  в распределения  $\rho(h)$ .

Как видно из рис. 4 и таблицы, АСМ-изображения VM3 в жидкости при температурах 10, 17, 22 и 30°C имеют округлую форму с высотами от  $2,7 \pm 0,1$  нм до  $6,8 \pm 0,9$  нм и латеральными размерами  $d < 50$  нм. Проведенное нами ранее исследование показало, что при АСМ-визуализации в жидкости VM3, иммобилизованного на АСМ-подложку, округлые объекты с высотами  $\sim 2,7 \pm 0,1$  нм относятся к мономерам, а объекты с большей высотой – к олигомерам [13]. Таким образом, в том случае, когда величина  $h_{\max 1}$  составила  $\sim 2,7$  нм, эта группа объектов была отнесена к мономерам белка, а группа объектов с большей высотой  $h_{\max 2}$  – к олигомерам. В тех случаях, когда оба значения  $h_{\max 1}$  и  $h_{\max 2}$  превышали значения характеристической высоты мономеров, обе груп-

пы относились к олигомерам разной стехиометрии (олигомеры 1 и олигомеры 2). При 10 и 17°C белок на АСМ-изображениях визуализировался преимущественно в виде олигомеров, а при более высокой температуре (22°C) часть олигомеров диссоциировала, и соотношение мономеров и олигомеров составило (0,3:0,7). При дальнейшем повышении температуры до 30°C VM3 на АСМ-изображениях снова визуализируется в виде олигомеров.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты АСМ-исследования и флуоресцентного анализа позволили сделать вывод, что плавление VM3 в низкотемпературном диапазоне происходит сложным многостадийным образом. Изменения интенсивности флуоресценции ароматических и флавиновых групп связа-

Значения максимума высоты  $h_{\max}$  и доля объектов, вычисленные по кривым аппроксимации плотности распределения АСМ-изображений VM3 по высотам  $\rho(h)$

Температура, °C	Тип объектов	Высота $h_{\max}$ , нм	FWHM, нм	Доля объектов, %
	Латеральные размеры $d < 50$ нм			
10	Олигомеры 1	$4,0 \pm 0,1$	2,8	$31 \pm 10$
	Олигомеры 2	$6,8 \pm 0,9$	6,8	$69 \pm 10$
17	Олигомеры 1	$3,3 \pm 0,1$	1,1	$49 \pm 10$
	Олигомеры 2	$4,5 \pm 0,4$	1,8	$51 \pm 10$
22	Мономеры	$2,7 \pm 0,1$	0,9	$26 \pm 10$
	Олигомеры	$4,3 \pm 0,5$	4,5	$74 \pm 10$
30	Олигомеры 1	$3,8 \pm 0,1$	1,6	$36 \pm 10$
	Олигомеры 2	$5,5 \pm 0,5$	3,2	$67 \pm 10$

Примечание: FWHM – Full width at half maximum, полная ширина на уровне максимальной полувысоты.

ны с изменениями структуры ВМЗ, которые в свою очередь вызывают изменения олигомерного состояния белка, что визуализировалось с использованием АСМ.

Данные флуоресцентного анализа в низкотемпературном диапазоне (10–30)°С показали, что при увеличении температуры раствора происходит синхронное, но разнонаправленное изменение интенсивности флуоресценции флавиновых групп по отношению к интенсивности флуоресценции ароматических остатков ВМЗ через последовательность трех переходов. S-образная форма переходов соответствует кооперативности процесса плавления и предполагает, что каждый из них происходит через согласованную потерю сразу нескольких взаимодействий между группами белка и их микроокружением [24]. При нагревании раствора ВМЗ от 10 до 30°С в процессе плавления белка происходят три кооперативных перехода, сопровождающихся изменением микроокружения как ароматических остатков, так и флавиновых групп. Изменение микроокружения вызывает изменение всей структуры молекулы белка и, как следствие, меняется степень его олигомеризации. Это подтверждается данными АСМ-исследований, согласно которым в этом диапазоне белок и его олигомеры имеют глобулярную форму, однако с повышением температуры от 10 до 22°С наблюдается снижение степени агрегации белка и доля мономеров возрастает.

Ширина S-образного перехода указывает на одновременное участие разных групп микроокружения в плавлении [25]. Физическая причина этого процесса заключается в росте энтропии системы: происходят небольшие растворимания движения боковых аминогрупп при небольших изменениях температуры [26]. При этом пептидные участки белковой глобулы связываются с ближайшими донорными или акцепторными группами, например, молекулами воды, пептидными группами, ионами, что и облегчает процесс дальнейшего плавления белка и вызывает изменения вторичной структуры белка, что отражается в виде S-образных участков на температурных зависимостях интенсивности флуоресценции белка [27].

Падение интенсивности флуоресценции ароматических остатков обычно связывают с повышением их гидрофобного микроокружения [16]. Возрастание интенсивности флуоресценции флавиновых групп в температурном диапазоне (10–37)°С свидетельствует о понижении степени гидрофобности микроокружения флавиновых групп в белке [17].

Интересно соотнести полученные данные по температурной денатурации белка с литературными данными по температурной зависимости активности ВМЗ. Согласно работам [5,6], максимум активности ВМЗ приходится на интервал температур (22–25)°С. Следовательно, согласно полученным в настоящей работе АСМ-данным, белок проявляет максимальную активность не в максимально свернутом состоянии. Вероятно, это необходимо для облегчения доступа субстрата в активный центр белка.

При дальнейшем повышении температуры раствора белка до 37°С данные флуоресцентного анализа свидетельствуют о дальнейших изменениях в микроокружении ароматических остатков ВМЗ, что иллюстрируется переходом от спада интенсивности флуоресценции этих групп к росту. Как показал АСМ-анализ при 33°С, смена микроокружения ароматических остатков с гидрофобного на гидрофильное вызывает небольшое увеличение степени агрегации белка. Это приводит к потере его активности [6,28,29]. При обратном охлаждении раствора ВМЗ от 33 до 16°С интенсивность флуоресценции ароматических групп пришла к начальному уровню, тогда как интенсивность флуоресценции флавиновых групп – нет (рис. 3). Это может указывать на то, что обратная перестройка микроокружения флавиновых простетических групп происходит с более высоким уровнем энергии активации, чем перестройка основной части глобулы, содержащей большую часть ароматических остатков.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, методы флуоресцентного анализа и АСМ позволили выявить особенности температурной денатурации ВМЗ. В диапазоне температур (10–33)°С наблюдалась последовательность трех кооперативных переходов, связанных с понижением гидрофобности окружения ароматических и флавиновых групп. При этом АСМ-эксперимент обнаружил соответствующие изменения степени олигомеризации, тогда как глобулярная форма белка сохранялась. Сравнение данных по структуре ВМЗ и литературных данных по активности фермента показало, что в области температуры максимальной активности он находится не в максимально компактном, а в легком расплавленном состоянии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. O. Narhi and A. J. Fulco, *J. Biol. Chem.* **261**, 7160 (1986).

2. I. Sevrioukova, H. Li, H. Zhang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 1863 (1999).
3. A. W. Munro, S. Daff, J. R. Coqqins, et al., Eur. J. Biochem. **239**, 403 (1996).
4. R. Neeli, H. M. Girvan, A. Lawrence, et al., FEBS Lett. **579**, 5582 (2005).
5. Yu. D. Ivanov, N. S. Bukharina, T. O. Pleshakova, et al., Biophysics **56**, 892 (2011).
6. S. C. Maurer, H. Schulze, R. D. Schmid, and V. Urlacher, Adv. Synth. Catal. **345**, 802 (2003).
7. A. W. Munro, J. G. Lindsay, J. R. Coggins, et al., Biochem. Biophys. Acta **1296**, 127 (1996).
8. D. J. Müller and A. Engel, Nat. Protoc. **2**, 2191 (2007).
9. V. Y. Kuznetsov, Yu. D. Ivanov, V. A. Bykov, et al., Proteomics **2**, 1699 (2002).
10. Yu. D. Ivanov, P. A. Frantsuzov, A. Zollner, et al., Res. Lett. **6**, 54 (2011).
11. V. Y. Kuznetsov, Yu. D. Ivanov, and A. I. Archakov, Proteomics **4**, 2390 (2004).
12. Yu. D. Ivanov, P. A. Frantsuzov, V. A. Bykov, et al., Anal. Methods **2**, 688 (2010).
13. Yu. D. Ivanov, N. S. Bukharina, P. A. Frantsuzov, et al., Soft Matter **8**, 4602 (2012).
14. T. Kitazume, D. C. Haines, R. W. Estabrook, et al., Biochemistry **46**, 11892 (2007).
15. H. M. Girvan, A. J. Dunford, R. Neeli, et al., Arch. Biochem. Biophys. **507**, 75 (2010).
16. A. D. Miller and J. Tanner, in *Essentials of Chemical Biology: Structure and Dynamics of Biological Macromolecules* (John Wiley&Sons Ltd., England, 2008), pp. 196–197.
17. A. W. Munro and M. A. Noble, in *Flavoprotein protocols* (Humana Press, Totowa, NJ, 1999), pp. 25–48.
18. .B. Carmichael and L. L. Wong, Eur. J. Biochem. **268**, 3117 (2001).
19. T. Omura and R. Sato, J. Biol. Chem. **239**, 2370 (1964).
20. K. Khan, S. Mazumdar, S. Modi, et al., Eur. J. Biochem. **244**, 361 (1997).
21. A. W. Munro, M. A. Noble, T. Ost, et al., *Subcellular Biochemistry* (Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000), **35**, p. 297–315.
22. A. Kowalska, M. Gyugos, D. Szego, et al., Food Chem. and Biotech. **71**, 35 (2007).
23. F. Forneris, R. Orru, D. Bonivento, et al., FEBS J. **276**, 2833 (2009).
24. A. I. Alexandrov, M. Mileni, E. Y. Chien, et al., Structure **16**, 351 (2008).
25. V. N. Uversky and O. B. Ptitsyn, Fold. Des. **1**, 117 (1996).
26. E. I. Shakhnovich and A. V. Finkelstein, Biopolymers **28**, 1667 (1989).
27. G. N. Ling, *Life at the cell and below-cell level* (Pacific Press, New York, 2001).
28. A. P. Jamakhandi, B. C. Jeffus, V. R. Dass, et al., Arch. Biochem. Biophys. **439**, 165 (2005).
29. R. Day, B. J. Bennion, S. Ham, and V. Daggett, J. Mol. Biol. **322**, 189 (2002).

## Atomic Force Microscopy Monitoring of Temperature Dependence of Cytochrome BM3 Oligomeric State

N.S. Bukharina\*, Yu.D. Ivanov\*, T.O. Pleshakova\*, P.A. Frantsuzov\*, N.D. Ivanova\*\*,  
N.V. Krohin\*, N.A. Petushkova\*, and A.I. Archakov\*

\**Institute of Biomedical Chemistry, ul. Pogodinskaya 10/8, Moscow, 119121 Russia*

\*\**Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology,  
ul. Akademika Skryabina 23, Moscow, 109472 Russia*

The change in temperature is one of the factors affecting the activity of enzymes. In this work thermal denaturation and aggregation of cytochrome P450 BM3 were studied by atomic force microscopy. To determine specific temperature transitions the fluorescence analysis was used. In the low melting temperature range, 10–33°C, a decrease in the fluorescence intensity of aromatic residues was observed with an increase in the fluorescence intensity of flavin groups. Protein melting in this range indicated three narrow S-shaped cooperative transitions at temperatures 16, 22 and 29°C. Atomic force microscopy analysis in this temperature range showed that the shape of BM3 molecules remained globular in the form of compact objects (heights  $h < 7$  nm, lateral dimensions  $d < 50$  nm), but protein oligomeric state changed. The first two transitions were accompanied by a decrease in the degree of oligomerization and the third one was accompanied by its increase.

*Key words: cytochrome P450, BM3, atomic force microscopy, cooperative transition, thermal denaturation*