

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии
наук

Отделение физики плазмы, атомной физики и астрофизики
Лаборатория Оптики биомолекул и кластеров

На правах рукописи

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛ NADH В РАСТВОРАХ
МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ВРЕМЯ-
РАЗРЕШЕННОЙ ЛАЗЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ**

Научный доклад Горбуновой Иоанны Алексеевны

Специальность 1.4.5 Оптика

Научный руководитель:
д.ф-м.н., зав. лаб. оптики
биомолекул и кластеров.,
Васютинский О.С.

Санкт-Петербург
2023

Научный руководитель:

д.ф.-м. н., зав. лаб. оптики биомолекул и кластеров ФТИ им. А.Ф. Иоффе
Васютинский Олег Святославович

Рецензенты:

к.ф.-м.н., н.с. лаб. оптики биомолекул и кластеров ФТИ им. А.Ф. Иоффе
Белашов Андрей Владимирович

к.ф.-м.н., м.н.с. лаб. нанобиотехнологий, СПБАУ РАН им. Ж.И. Алферова
Ступин Даниил Дмитриевич

Актуальность темы исследования

Лазерные методы изучения процессов, происходящих в биологических образцах и в живых клетках занимают очень большое место в арсенале современной физики, которая имеет очевидную тенденцию к исследованиям, направленным на изучение живой природы и на создание приборной и методической базы для решения сложных проблем современной биологии и медицины [1, 2]. Это, в частности, связано с неинвазивностью и информативностью лазерных методов исследования, а также с быстрым развитием применения ультракоротких лазерных импульсов с длительностью, сравнимой и меньшей, чем характерные времена процессов, происходящих в биологических образцах при комнатной температуре. На настоящий момент для исследования динамики биологических процессов в режиме реального времени осуществляется мониторинг флуоресценции биологических флюорофоров с высоким временным разрешением методом счета фотонов с временной корреляцией (TCSPC) [3]. В частности, большой интерес представляют исследования флуоресценции естественных внутриклеточных коферментов NADH и NADPH, которые являются регуляторами и индикаторами окислительно-восстановительных реакций, происходящих в клетках живых организмов [2, 4].

Для детального понимания природы происходящих внутриклеточных процессов необходимо исследовать динамику возбужденных состояний этих коферментов, которая характеризуется процессами быстрой изотропной и анизотропной безызлучательной релаксации, переносом энергии между молекулярными группами и вращательной диффузии. Характерные времена этих процессов можно определить, используя поляризационно-чувствительные методы исследования, в которых независимым образом контролируются поляризации всех фотонов, участвующих в фотопроцессе, которые позволяют получать богатую информацию об анизотропии происходящих физико-химических процессов. Например, времена вращательной диффузии при определенных условиях могут служить

индикатором внутриклеточной вязкости, а также процессов связывания коферментов с белками при протекании внутриклеточных реакций. [5] Другие параметры, получаемые при анализе сигналов затухания поляризованной флуоресценции (времена затухания флуоресценции, параметр анизотропии флуоресценции и времена деполяризации флуоресценции), в основном зависят от положения исследуемой молекулы в клетке и окружающих биохимических процессов, что может быть использовано для неинвазивного мониторинга клеточного метаболизма. Несмотря на то, что актуальность этих исследований и их возможные важные практические применения были установлены уже много десятилетий назад [5], одной из важнейших возникающих проблем являлась количественная (и даже качественная) интерпретация получаемых сигналов затухания флуоресценции и конкретная связь этих сигналов с физико-химическими процессами релаксации и переноса энергии в возбужденных состояниях исследуемых флуорофоров. [2]

Исследования поляризационно-зависимых фотофизических и фотохимических свойств кофермента NADH имеют значительную актуальность для мирового научного сообщества, поскольку, основываясь на результатах исследований, может быть получена детальная информация о динамике окислительно-восстановительных реакций с участием NADH, о переносе протонов и электронов в процессе этих реакции, генерация активных форм кислорода NADH содержащими ферментами, фотоизомеризация и фотофрагментация молекул NADH. Разработанные теоретические модели могут иметь важное значение для описания процессов структурного преобразования коферментов NADH в ходе окислительно-восстановительных реакций в живых клетках. Кроме того, на настоящий момент существует достаточно высокая потребность в разработке новых спектральных методов для неинвазивного исследования животных клеток, растительных клеток, а также бактерий и микроорганизмов без нарушения их жизненного цикла.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы является проведение комплексных исследований

динамики возбужденных состояний NADH в свободной форме и при связывании с ферментом алкоголь-дегидрогеназа в растворах методом флуоресцентной время-разрешенной лазерной спектроскопии.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести эксперименты по наблюдению затухания поляризованной флуоресценции молекул NADH в водных-растворах метанола при двухфотонном возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами методом счета фотонов с временной корреляцией (TCSPC).

2. Разработать алгоритм одновременного анализа сигналов затухания ортогональных поляризационных компонент флуоресценции с целью определения экспериментальных параметров: времен затухания флуоресценции, весовых коэффициентов, времени вращательной диффузии и начальной анизотропии флуоресценции.

3. Провести интерпретацию времен затухания флуоресценции, весовых коэффициентов, времени вращательной диффузии, коэффициентов анизотропии с точки зрения влияния свойств микроокружения и молекулярных конформаций NADH.

4. Провести эксперименты по наблюдению затухания поляризованной флуоресценции NADH при связывании с ферментом алкогольдегидрогеназа (ADH) в растворе. Проанализировать различия в параметрах затухания флуоресценции свободного NADH и комплекса NADH-ADH и объяснить природу этих различий.

Научная новизна

1. Впервые показано, что наличие двух времен затухания флуоресценции NADH обусловлено различным распределением заряда в цис- и транс-конфигурациях никотинамида.

2. Разработан и апробирован принципиально новый метод определения относительного количества сложенных и развернутых конформации

NADH.

3. Впервые показано, что единственное время затухания флуоресценции $\tau_4 = 4$ нс в комплексе NADH-ADH обусловлено низкой полярностью сайта связывания фермента и тем, что NADH находится в этом сайте в единственной транс-конфигурации.

4. Обнаружено существование анизотропного механизма релаксации в возбужденном состоянии комплекса NADH-ADH со временем $\tau_b = 1$ нс, обусловленного быстрой перестройкой конфигурации ядер NADH в возбужденном состоянии.

Научная и практическая значимость

Научная значимость работы заключается в том, что впервые было предложено объяснение гетерогенности затухания флуоресценции NADH, показано, что эти времена связаны с цис- и транс-конформациями никотинамида. Модель может быть использована для интерпретации времен затухания флуоресценции других биологических молекул, которые могут существовать в цис- и транс-конформациях. Кроме того, впервые объяснено существование единственного времени затухания флуоресценции при связывании NADH с ферментами, что в дальнейшем может быть использовано для фундаментальных исследований взаимодействий лиганд-рецептор.

Практическая значимость исследований заключается в том, исследования, полученные в рамках настоящей работы, являются частью исследовательского проекта, направленного на разработку неинвазивных методик ранней диагностики социально-значимых заболеваний и диагностики клеточных патологий в режиме реального времени. Особенностью этих методов является то, что диагностика может проводиться при естественных условиях жизненного цикла клеток и тканей и без необходимости использования флуоресцентных маркеров, которые зачастую обладают токсичным эффектом. Результаты будут непосредственно использованы для разработки методов мониторинга окислительно-восстановительных реакций в живых клетках,

контроля изменений метаболических путей клеток и мониторинга локальной внутриклеточной вязкости.

Апробация работы и публикации

Результаты работы были доложены на 15 всероссийских и международных научных конференциях в качестве 11 устных и 4 постерных докладов.

Список наиболее значимых публикаций по результатам исследований:

1. I. A. Gorbunova, M. E. Sasin, Y. M. Beltukov, A. A. Semenov, O. S. Vasyutinskii, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2020, Vol. 22, pp. 18155-18168;

2. I. A. Gorbunova, M. E. Sasin, J. Rubayo-Soneira, A. G. Smolin, O. S. Vasyutinskii, *J. Phys. Chem. B*, 2020, 124 (47), 10682-10697.

3. Ioanna A. Gorbunova, Maxim E. Sasin, Dmitrii P. Golyshev, Alexander A. Semenov, Andrey G. Smolin, Yaroslav M. Beltukov, Oleg S. Vasyutinskii, *J. Phys. Chem. B*, 2021, 125(34), 9692-9707.

4. I. A. Gorbunova, N. O. Bezverkhni, A. A. Zhikhoreva, Y. M. Beltukov, M. E. Sasin, J. Rubayo-Soneira, O. S. Vasyutinskii, *Proc. SPIE 11076, Advances in Microscopic Imaging II*, 1107621, (22 July 2019);

5. Gorbunova I. A., Sasin M. E., Vasyutinskii O. S., *Technical Physics Letters*, 2020, Vol. 46, No. 2, pp. 158-160;

6. Ioanna A. Gorbunova, Nikolai O. Bezverkhni, Maxim E. Sasin, Idris M. Gadzhiev, Daria A. Gorbenko, Oleg S. Vasyutinskii, *Proc. SPIE 11497, Ultrafast Nonlinear Imaging and Spectroscopy VIII*, 1149713, (20 August 2020).

7. Ioanna A. Gorbunova, Maxim E. Sasin, Dmitry P. Golyshev, Marina K. Krasnopevtceva, Andrey G. Smolin, Yaroslav M. Beltukov, Oleg S. Vasyutinskii, *Proceedings Volume 11900, Optics in Health Care and Biomedical Optics XI*; 119003G (2021).

Метод исследования

Для исследований флуоресценции молекул NADH был использован метод поляризационной флуоресцентной лазерной спектроскопии с пикосекундным временным разрешением. В данном методе возбуждение поляризованной флуоресценции исследуемых молекул осуществлялась посредством

двухфотонного поглощения при облучении линейно- или циркулярно-поляризованным лазерным излучением с импульсами фемтосекундной длительности. Геометрия эксперимента и основные функциональные узлы схематически представлены на Рис. 1.

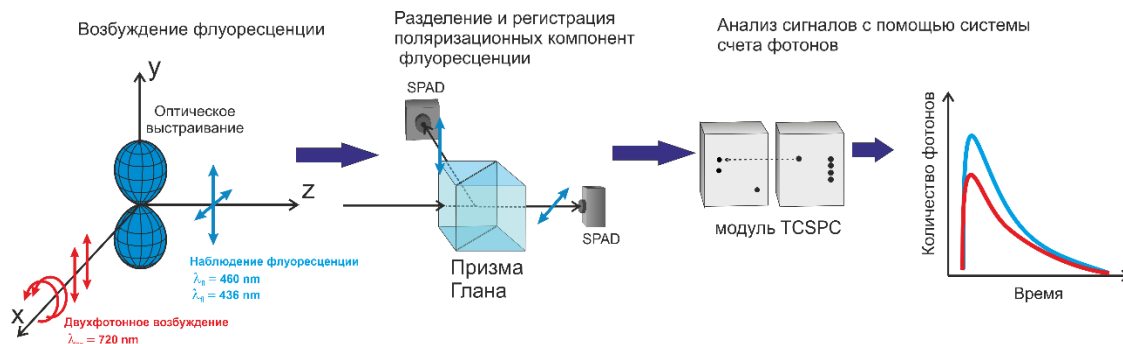


Рисунок 1 — Упрощенная схема экспериментального метода.

Возбуждающий лазерный пучок фокусировался в центр кварцевой кюветы, содержащей исследуемый раствор, в узкую перетяжку для увеличения вероятности двухфотонного поглощения и исследования молекул только в малом фокальном объеме. В качестве источника возбуждения использовался Ti:Sapphire лазер (Mai:Tai HP, Spectra Physics), перестраиваемый в диапазоне длин волн 690-1040 нм, с длительностью импульса 100 фс и частотой повторения импульсов 80 МГц. Возбуждение молекул осуществлялось линейно- или циркулярно-поляризованным излучением. Контроль поляризации лазерного пучка осуществлялся при помощи двух последовательно расположенных фазовых пластин $\lambda/2$ и $\lambda/4$. При воздействии поляризованного лазерного излучения преимущественно возбуждались только те молекулы, главная ось которых параллельна плоскости поляризации возбуждающего излучения. Таким образом происходило выстраивание осей возбужденных молекул, в результате чего наблюдалось частично поляризованное излучение флуоресценции. Степень поляризации излучения флуоресценции и его затухание во времени несло в себе важную информацию о анизотропных процессах релаксации возбужденных состояний исследуемых молекул. Примером таких процессов являются поворот дипольного момента флуоресценции, который обусловлен перестройкой ядерной конфигурации в процессе колебательной релаксации в

возбужденном состоянии, и вращательная диффузия, которая обусловлена переориентацией молекулярных осей при взаимодействии с молекулами растворителя. Поляризованная флуоресценция регистрировалась под прямым углом к направлению распространения возбуждающего лазерного пучка, чтобы избежать попадания рассеянного лазерного излучения в канал детектирования. Далее две ортогональные компоненты поляризованной флуоресценции I_{\parallel} и I_{\perp} разделялись при помощи призмы Глана. Сигнал флуоресценции для каждой компоненты поляризации регистрировался одновременно и независимо двумя быстрыми лавинными фотодиодами ($\text{\$APD-050-CTC}$, MPD), работающими в режиме счета фотонов. Электрические импульсы с выхода фотодиодов обрабатывались системой счета фотонов с временной корреляцией TCSPC PicoHarp300 (PicoQuant), с частотой дискретизации 4 пс.

Сигналы затухания поляризованной флуоресценции и их анализ

Примеры экспериментальных сигналов затухания ортогональных компонент поляризованной флуоресценции I_{\parallel} и I_{\perp} NADH в водном растворе, полученных при двухфотонном возбуждении линейно- и циркулярно-поляризованным лазерным излучением, представлены на Рис. 2.

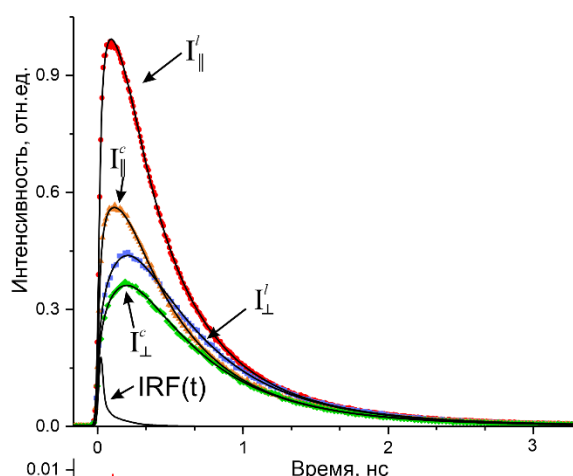


Рисунок 2 — Сигналы затухания ортогональных компонент поляризованной флуоресценции, $\text{IRF}(t)$ — функция отклика детекторов.

Анализ сигналов затухания поляризованной флуоресценции проводился следующим образом.

В общем случае, при возбуждении линейно поляризованным излучением сигналы затухания ортогональных компонент поляризованной флуоресценции описываются с помощью следующих выражений:

$$I_{\parallel} = G \int_0^t IRF(t') I_{iso}(t - t') [1 + 2r_{l/c}(t - t')] dt', \quad (1)$$

$$I_{\perp} = G \int_0^t IRF(t') I_{iso}(t - t') [1 - r_{l/c}(t - t')] dt', \quad (2)$$

где $I_{iso}(t - t')$ и $r_{l/c}(t - t')$ - изотропная интенсивность и анизотропия, соответственно, $IRF(t')$ - функция отклика детектора, а G - коэффициент, характеризующий различие в чувствительности каналов детектирования к ортогональным компонентам поляризации. При возбуждении циркулярно-поляризованным лазерным излучением знак при анизотропии $r_l(t - t')$ меняется местами в выражениях (1) и (2).

Изотропная (независящая от поляризации) часть сигнала флуоресценции может быть описана функцией, представляющей собой сумму нескольких экспонент [6]:

$$I_{iso}(t) = \frac{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)}{3} = I_0 \sum_{i=1}^n a_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right), \quad (3)$$

где I_0 - независимая от времени начальная интенсивность флуоресценции, времена затухания, а a_i - соответствующие весовые коэффициенты, нормированные на единицу.

Затухание анизотропии флуоресценции определяется исходя из следующего выражения $r(t)$ [7]:

$$r_l(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (4).$$

Для анализа сигналов на Рис. 2 была написана программа Python3. Для определения параметров изотропной и анизотропной составляющей сигнала использовалась процедура глобальной аппроксимации выражений (1) и (2), где времена затухания флуоресценции τ_i , весовые коэффициенты a_i , времена вращательной диффузии τ_{ri} , времена деполяризации τ_{vri} и параметр анизотропии r_i использовались в качестве параметров аппроксимации. Для построения целевой функции использовался метод максимального правдоподобия (Maximum likelihood estimation), в котором при большом числе фотонов (более 5000 счетов) использовалось нормальное распределение, а при малом числе фотонов использовалось распределение Пуассона. Минимизация целевой функции осуществлялась с помощью алгоритма дифференциальной эволюции из библиотеки SciPy. Времена затухания флуоресценции, весовые коэффициенты, начальная анизотропия и время вращательной диффузии выступали в качестве глобальных параметров аппроксимации. Аппроксимация сигналов затухания флуоресценции для случаев линейной и циркулярной поляризации возбуждающего излучения проводилась отдельно.

Затухание поляризованной флуоресценции свободного NADH в водных растворах метанола

Известно, что изотропное затухание флуоресценции NADH описывается суммой двух экспонент с характерными временами затухания τ_1 и τ_2 [8]:

$$I_{iso}(t) = I_0 \left[a_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + a_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \right] \quad (5)$$

Затухание анизотропии флуоресценции NADH описывается одной экспонентой с временем вращательной диффузии τ_{rot} и коэффициентом начальной анизотропии r_0 :

$$r_{l/c}(t) = r_{0r/c} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{rot}}\right) \quad (6)$$

В результате анализа сигналов затухания поляризованной флуоресценции NADH в водных растворах метанола различной концентрации были получены

параметры затухания флуоресценции и их зависимость от концентрации метанола в растворе. Полученные параметры представлены на Рис. 3 и 4.

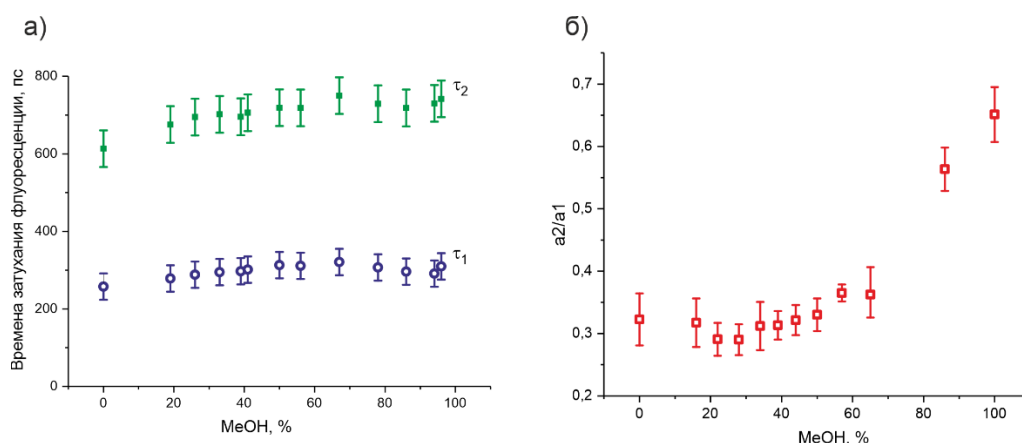


Рисунок 3— а) Времена затухания флуоресценции NADH τ_1 и τ_2 б) отношение весовых коэффициентов в зависимости от концентрации метанола в растворе.

Как видно из Рис. 3 а), оба времени затухания монотонно возрастают с увеличением концентрации метанола до 40 %, тогда как при более высоких концентрациях оба времени не меняются. Значения времен затухания флуоресценции τ_1 и τ_2 в чистой воде на Рис. 3 а) согласуются со значениями, о которых сообщалось ранее для NADH при одно- и двухфотонном возбуждении в пределах экспериментальных погрешностей [8; 9]. Кроме того, оба времени затухания в чистом метаноле, примерно совпадают с временами, полученными ранее [10].

Отношение весовых коэффициентов, которое характеризует относительный вклад длинного времени затухания в сигнал флуоресценции, в зависимости от концентрации метанола в растворе представлено на Рис. 3 б).

Как видно из Рис. 3 б), при концентрации метанола ниже 70 % вклад времени τ_2 практически не меняется и равен примерно 0.24, однако при более высоких концентрациях метанола увеличивается практически в два раза. Значения весового коэффициента a_2 в чистой воде и в 50% растворе метанола согласуются с данными, полученными Блэкером и др. [8] и с более ранними результатами Кришнамурти и др. [10] в пределах погрешности эксперимента. Вклад длинного времени затухания флуоресценции NADH τ_2 в чистом метаноле так-же согласуется с результатом, полученным Кришнамурти и др. [10]

Время вращательной диффузии NADH в зависимости от концентрации метанола в растворе представлено на Рис. 4.

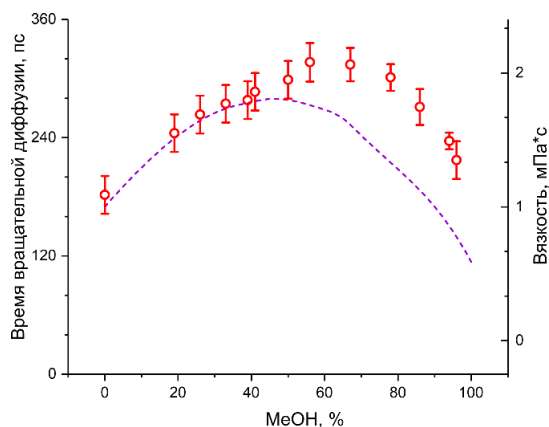


Рисунок 4—Время вращательной диффузии NADH в зависимости от концентрации метанола в растворе.

Как видно из Рис. 4 наблюдается немонотонная зависимость времени вращательной диффузии от концентрации метанола в растворе. Максимальное значение времени вращательной диффузии достигается при концентрации метанола около 60 %. Как показано на Рис. 4, время вращательной диффузии NADH в водном растворе было равно $\tau = 180 \pm 30$ пс с учетом погрешности эксперимента, что хорошо согласуется с результатами, полученным ранее [9, 11].

Объяснение существования двух времен затухания флуоресценции NADH

На протяжении нескольких десятков лет шла дискуссия о природе двух времен затухания флуоресценции NADH. Некоторые исследователи полагали, что наличие двух времен затухания флуоресценции обусловлено свернутой и развернутой геометрическими конфигурациями NADH. А именно более длительное время затухания флуоресценции τ_2 относится к сложной конформации, тогда как более короткое время характеризует затухание флуоресценции развернутой конформации. Эта гипотеза столкнулась с несколькими противоречиями: одна из них это существование двух времен затухания флуоресценции у восстановленного никотинамид мононуклеотида (NMNH). Другие исследователи

предполагали, что эти времена обусловлены внутренними свойствами никотинамида [9; 10]. Несмотря на большое число исследований конкретная физическая модель, объясняющая существование двух времен затухания флуоресценции NADH, до сих пор не была предложена. В настоящей работе предложена модель интерпретации неоднородности затухания флуоресценции NADH, которая основана на распределении зарядов внутри кольца никотинамида для *cis* и *trans* конфигураций.

Для интерпретации неоднородности измеренных времен затухания флуоресценции NADH анализ экспериментально определенных времен затухания τ_1 и τ_2 и соответствующих весовых коэффициентов a_1 и a_2 был объединен с результатами расчетов *ab initio* NADH. *Ab initio* расчеты структур NADH были выполнены в газовой фазе, в воде и в метаноле с помощью программного пакета Gaussian09. В результате расчетов были получены значения энергии электронных уровней, вертикальные энергии возбуждения, силы осцилляторов и дисперсионных энергиях. Эти параметры были проанализированы с точки зрения влияния расстояния между аденином (AD) и никотинамидом (NA) R_{NA-AD} и углом поворота амидной группы относительно пиридинового кольца ϕ . Структура NADH с представлена на Рис. 5.

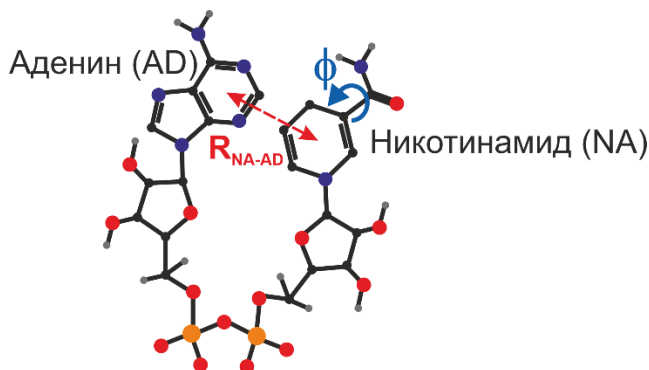


Рисунок 5—Структура молекулы NADH.

В результате расчетов было получено, что вертикальные энергии возбуждения и силы осцилляторов для первого возбужденного состояния незначительно отличаются для различных геометрических конфигураций NADH. При этом прямой корреляции этих параметров с расстоянием между AD и NA установить не удалось. Помимо свернутых и развернутых конформаций NADH, также было рассмотрено влияние различных конфигураций никотинамида (NA) на энергетическую

структуру и внутримолекулярное распределение зарядов, а именно влияние положения амидной группы относительно пиридинового кольца. Как показано на Рис. 5 эти конформации характеризуются углом φ , и при $\varphi = 180 \pm 15^\circ$ относится к цис- конформации, а именно когда атом О амидной группы находится около атома N пиридинового кольца, и при $\varphi = 0 \pm 30^\circ$ относится к транс конформации, когда атом О амидной группы находится около CH₂ группы пиридинового кольца. Для цис- и транс- конфигураций NADH в воде в основном состоянии и в первом возбужденном состоянии в равновесной конфигурации были посчитаны распределения зарядов, которые представлены на Рис. 6.

Как видно на Рис. 6, распределения заряда для цис- и транс- конфигураций значительно отличаются друг от друга. Такое распределение заряда приводит к различным конфигурациям электрического поля для цис- и транс- форм, что приводит к наблюдению двух времен затухания флуоресценции NADH. Также из расчетов *ab initio* было показано, что направление дипольного момента перехода флуоресценции отличается для цис- и транс-конфигурации кольца NA более чем на 10° .

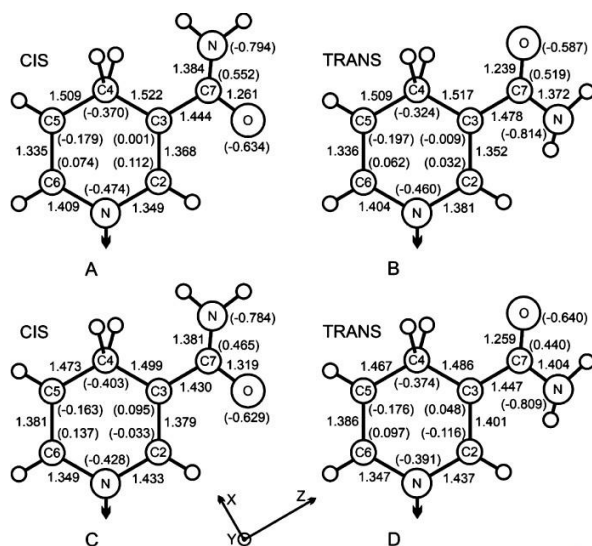


Рисунок 6 — Точечные заряды в цис- и транс- конфигурации никотинамидного кольца для развернутой конформации NADH в воде, рассчитанные по Милликену.

А) цис и Б) транс конформации никотинамида в основном состоянии.

В) цис и Г) транс конформации никотинамида в первом возбужденном состоянии.

Различие в направлении TDM флуоресценции для цис- и транс-

конформаций подтверждает гипотезу о влиянии распределения заряда на электронную структуру молекулы NADH в возбужденном состоянии. Исходя из весовые коэффициенты a_2 и a_1 описывают относительную заселенность цис- и транс- энергетических состояний на ландшафте потенциальной энергии всей системы в электронном возбужденном состоянии NADH. А именно весовые коэффициенты характеризуют какая доля флуоресценции приходится на цис- и транс- конформации. В начальный момент времени $t = 0$ возбуждающий лазерный импульс переводит молекулу из основного состояния в высоковозбужденные колебательные уровни энергии электронного возбужденного состояния. На энергетической диаграмме эти состояния находится выше энергии потенциального барьера, соответствующего переходу из цис- в транс-конформацию. Величина барьера была рассчитана в работе Ву и Хоук [12] и составил около 7 ккал/моль, что на порядок выше энергии колебаний в основном состоянии молекул при комнатной температуре. Последующая колебательная релаксация в возбужденном состоянии NADH, происходящая в пикосекундной временной области, приводит к заполнению обеих потенциальных ям для цис- и транс- состояний. При этом вероятность заполнения этих ям зависит от структуры молекулы и от взаимодействий с молекулами растворителя.

Предложенная интерпретация неоднородности времени жизни возбужденного состояния NADH в растворах может дать новое представление о длительных дискуссиях о происхождении внутриклеточного многокомпонентного затухания флуоресценции NADH. Блэкер и др. [9] в своей недавней работе также указывали на важную роль цис- и транс-конформаций никотинамида в гетерогенности затухания флуоресценции NADH. Однако, Блэк и др. использовали модель Крамерса-Кронекера и рассматривали систему в рамках классической термодинамики. В настоящей работе предложена принципиально новая модель, основанная на квантово-химических расчетов молекулы NADH в основном и в первом возбужденном состоянии, для качественного понимания природы наблюдаемых в эксперименте времен затухания флуоресценции NADH.

Определение относительных концентраций сложенных и развернутых конформаций NADH

Поведение времени вращательной диффузии NADH было проанализировано с точки зрения влияния вязкости раствора. Как видно из Рис. 4, при концентрации метанола от 0 до 40% время вращательной диффузии τ_{rot} увеличивается пропорционально вязкости раствора. Однако при концентрациях метанола более 40 % прямая зависимость между τ_{rot} и вязкостью нарушается. Время вращательной диффузии τ_{rot} на Рис. 4 может быть описано обобщенным выражением Стокса-Эйнштейна-Дебая [13],

$$\tau_{rot} = fC \frac{\eta V_M}{kT} \quad (7).$$

где k – постоянная Больцмана и абсолютная температура, соответственно, V_M – ван-дер-Ваальсов объем молекулы, η – макроскопическая вязкость растворителя, параметр f – форм фактор, введенный для учета несферической формы молекул растворенного вещества, и коэффициент смачиваемости C характеризует степень связи между растворенным веществом и растворителем.

Интерпретация зависимости времени вращательной диффузии τ_{rot} от концентрации метанола на Рис. 4 была выполнена путем рассмотрения упрощенной модели, в которой время вращательной диффузии τ_{rot} было представлено в виде суммы вкладов от свернутой и развернутой конформаций. Также в модели было учтено различие в квантовом выходе для сложенной и развернутой конформации NADH. Также из расчетов структуры NADH был определен формфактор f для условий полной смачиваемости. Относительная концентрация сложенных конформаций была посчитана для нескольких различных условий, характеризующихся параметрами C_f , C_{un} , V_f и V_{un} . Результаты расчета представлены на Рис. 7.

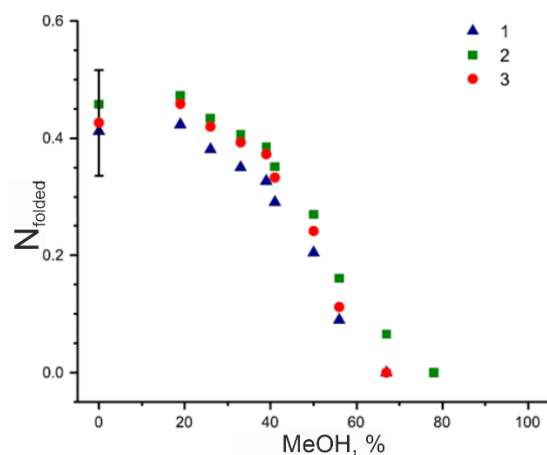


Рисунок 7 — Относительная концентрация сложенных конформаций N_{folded} NADH в зависимости от концентрации метанола в растворе

Как видно на Рис. 7, относительная концентрация сложенных конформаций N_f NADH в чистой воде составляла около 0.4, а затем снижалась до нуля с увеличением концентрации метанола в растворе. Значения N_f , полученные в этой работе, согласуются результатами, полученными ранее другими методами исследования: ЯМР спектроскопии [14; 15], методом спектроскопии накачка-зондирование [16; 17] и флуоресцентной спектроскопии [20]. В частности, значение N_f в чистой воде при температуре 20°, показанное на рисунке 2.9, составило около 0.4 ± 0.1 , что согласуется с результатами, полученными Oppenheimer et al. [14] (0.36) и Heiner et al. (0.26 ± 0.06) [16]. Однако значение N_f , полученное в этой работе для водного раствора, отличалось от результатов в работах [15, 17] (0.55).

Затухание поляризованной флуоресценции NADH, связанного с ферментом алкоголь-дегидрогеназа (ADH)

В настоящей работе были проведены экспериментальные и теоретические исследования процессов релаксации возбужденного состояния NADH при связывании с ферментом алкоголь дегидрогеназой. Были изучены следующие особенности процессов релаксации возбужденного состояния комплексов NADH-ADH: значительное увеличение наблюдаемого наносекундного времени затухания флуоресценции в связанном с ферментом NADH по сравнению с его свободными формами в растворе, неоднородность времен затухания флуоресценции в связанном с ферментом NADH в зависимости от

локального микроокружения сайта связывания, определение относительных концентраций свободного и связанного NADH при одновременном наблюдении их флуоресценции, а также природа времен деполяризации флуоресценции. Сигналы затухания поляризованной флуоресценции двухкомпонентных комплексов NADH-ADH были получены для 50 μM раствора ADH с добавлением NADH в концентрации 25 μM .

Для определения характерных времен затухания флуоресценции нами была проанализирована изотропная (нечувствительная к поляризации) часть сигнала затухания флуоресценции $I_{iso}(t)$, которая была получена согласно выражению (3) из двух ортогонально поляризованных компонент флуоресценции. Для оценки возможности разделения параметров затухания связанного с ферментом и свободного NADH в растворе изотропный сигнал затухания флуоресценции $I_{tot}(t)$ был проанализирован с использованием функции суммы двух, трех и четырех экспонент. Результаты представлены в Таблице 1.

Таблица 1 — Времена затухания флуоресценции τ раствора NADH-ADH и NADH, весовые коэффициенты a и отношение концентраций связанного и свободного NADH в растворе N_f/N_b .

	τ_1 , ns (a_1)	τ_2 , ns (a_2)	τ_3 , ns (a_3)	τ_4 , ns (a_4)	χ^2	N_f/N_b
2 exp	-	-	0.30 (0.63)	3.65 (0.37)	1.97	1.72
3 exp	-	0.12 (0.50)	0.77 (0.25)	4.69 (0.25)	1.17	0.96
4 exp	0.10 (0.38)	0.30 (0.24)	0.90 (0.17)	4.85 (0.21)	1.15	0.90
4 exp (fix)	0.10 (0.45)	0.24 (0.05)	0.66 (0.25)	4.50 (0.25)	1.18	0.80

Было получено, что упрощенная модель, в которой предполагается наличие только одного времени затухания флуоресценции свободного NADH и одного времени затухания флуоресценции комплекса NADH-ADH, показывает неудовлетворительное качество аппроксимации. Это указывает на то, что простой одноэкспоненциальной модели для свободного и связанного состояния NADH является недостаточно для понимания динамики процессов, происходящих в возбужденном состоянии обеих форм кофермента. При

использовании модели с тремя и четырьмя экспонентами, помимо наносекундного времени затухания τ_4 , появлялось короткое короткое время затухания флуоресценции порядка 0.10–0.12 нс, которое было сильно меньше, чем времена затухания, наблюдаемые для свободного NADH в растворе. Короткое время затухания флуоресценции не наблюдалось для свободного NADH как при исследовании кофермента в настоящей работе, так и в исследованиях, проводимых ранее другими научными группами [8; 114; 18]. Однако при исследовании динамики возбужденного состояния NADH методом ап-конверсионной спектроскопии было определено время затухания порядка 26 пс [19]. В некоторых работах сообщалось о наличии времени затухания флуоресценции порядка 0.08–0.12 нс при исследовании связанного с ферментом NADH [20; 21; 22]. Было показано, что модель с четырьмя экспонентами является наиболее предпочтительной для анализа сигналов затухания флуоресценции в случае совместного наблюдения свободного и связанного с ферментом NADH. На основании результатов из третьей и четвертой строк Таблицы 1 было выделено две группы времен затухания: два времени затухания τ_1 и τ_4 , которые ассоциировались с флуоресценцией комплекса NADH–ADH, и времена τ_2 и τ_3 , которые ассоциировались с флуоресценцией свободного NADH в растворе.

В настоящей работе основываясь на полученных временах затухания и соответствующих весовых коэффициентов была определена относительная концентрация связанного с ферментом и свободного NADH в растворе N_f / N_b . Особенностью определения относительной концентрации двух форм кофермента является учет различия квантового выхода для комплекса NADH–ADH и свободного NADH.

Объяснение природы времени затухания флуоресценции комплекса NADH–ADH

Анализ наносекундного времени затухания флуоресценции комплекса NADH–ADH τ_4 был проведен на основе модели цис- и транс-конформаций

NADH, которая была разработана в рамках настоящей работы. Неоднородность измеренных времен затухания флуоресценции свободного NADH в водно-метанольных растворах была объяснена с помощью расчетов *ab initio*, которые показали различное распределение заряда в цис- и транс-конформациях NADH. В этой модели предполагается, что существование цис- и транс-конформаций NADH приводит к неоднородности измеренных времен затухания флуоресценции, поскольку разные распределения заряда в этих конформациях обуславливают различия распределения внутримолекулярного электростатического поля. В свою очередь это приводит к тому, что скорость процессов безызлучательной релаксации отличается для цис- и транс-конформаций NADH. Как известно из рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии, в сайтах связывания ферментов NADH находится в единственной конформации. [] Таким образом наблюдение единственного наносекундного времени затухания флуоресценции комплекса NADH-ADH можно понять в рамках вышеупомянутой модели, поскольку NADH в сайте связывания ADH всегда находится в транс- конформации.

В ранних исследованиях значительное увеличение времени затухания флуоресценции связанного состояния NADH обычно объясняли низкой полярностью сайта связывания [125]. Однако до настоящего времени описание конкретного механизма не было предложено. В настоящей работе для качественного объяснения изменения скоростей процессов безызлучательной релаксации в возбужденном состоянии свободного NADH и комплекса NADH-ADH была разработана модель на основе *ab initio* расчетов. Для этого были проведены *ab initio* расчеты электронной структуры NADH в условиях различной диэлектрической проницаемости ϵ . Результаты расчета представлены на Рис. 8.

Как видно на Рис. 8, при низких значениях ϵ отрицательный заряд на атоме кислорода резко уменьшается. Принимая во внимание, что внутримолекулярные электростатические поля обычно очень сильны, небольшие изменения заряда могут значительно влиять на скорость безызлучательной релаксации и приводят к резкому увеличению времени затухания флуоресценции NADH в комплексе с ADH.

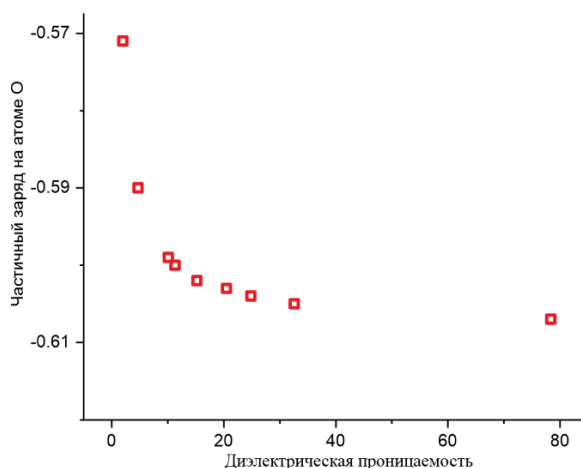


Рисунок 8 — Точечный заряд на атоме кислорода амидной группы молекулы NADH в зависимости от диэлектрической проницаемости окружения

Анизотропия флуоресценции комплекса NADH-ADH

Для анализа сигналов ортогональных поляризационных компонент флуоресценции была разработана модель, в которой предполагается, что экспериментальный сигнал может быть представлен как сумма вкладов связанного с ферментом и свободного NADH. Для упрощения вычислений времена затухания флуоресценции свободного NADH $\tau_{f2} = 0.24$ нс и $\tau_{f3} = 0.66$ нс и параметр анизотропии $f = 0.49$ были зафиксированы.

Изотропное затухание комплекса NADH–ADH было представлено в виде суммы двух экспонент:

$$I_{iso}^b(t) = I_0 [a_{b1} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{b1}}\right) + a_{b2} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{b2}}\right)] \quad (8)$$

Для анализа анизотропной части сигналов затухания поляризованной флуоресценции комплекса NADH–ADH использовалось выражение, в котором учитывались как процесс анизотропной колебательной релаксации с характерным временем τ_{bv} так и процесс вращательной диффузии с характерным временем τ_{br} :

$$r^b(t) = \left(r_0^{b1} + r_0^{b2} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{bv}}\right) \right) \exp\left(-\frac{t}{\tau_{br}}\right) \quad (9)$$

Согласно оценке времени вращательной диффузии комплекса NADH-ADH, учитывая массу и молекулярный объем комплекса, оно должно составлять порядка 30-40 нс [33, 24, 29], что намного больше, чем характерные

времена затухания флуоресценции и период следования лазерных импульсов, что не позволяет обнаружить данное время в условиях нашего эксперимента. Таким образом, время вращательной диффузии $\tau_{br} = 30$ нс было зафиксированно.

В результате анализа экспериментальных сигналов раствора NADH-ADH и свободного NADH замечаний были получены следующие результаты. получено время вращательной диффузии свободного NADH, $\tau_{fr} = 0.17$ нс, которое полностью согласуется с полученным в наших предыдущих экспериментах для водного раствора. Впервые было определено время деполяризации флуоресценции $\tau_{bv} = 0.89$ нс для комплекса NADH-ADH. Было сделано предположение, что это время деполяризации флуоресценции характеризует быструю анизотропную колебательную релаксацию в возбужденном состоянии после лазерного импульса, приводящую к повороту дипольного момента перехода NADH из-за перестройки конфигурации ядер. Для сравнения на Рис. 9 представлены сигналы затухания анизотропии флуоресценции $r(t)$ для свободного NADH (синие точки) и для комплекса NADH-ADH (зеленые точки), полученные из экспериментальных сигналов ортогональных компонент поляризованной флуоресценции согласно выражению (4).

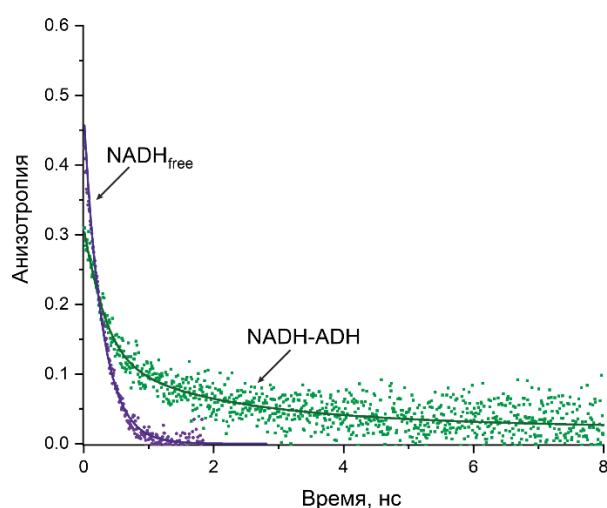


Рисунок 9 — Точечный заряд на атоме кислорода амидной группы молекулы NADH в зависимости от диэлектрической проницаемости окружения

Наличие времени анизотропной колебательной релаксации τ_{bv} среди

определенных из анализа экспериментальных сигналов параметров затухания флуоресценции представляет наибольший интерес, поскольку оно зависит от вязкости и полярности сайта связывания ферментов и может использоваться вместе с другими временами затухания для описания кинетики окислительно-восстановительных реакций.

Заключение

Экспериментально исследована поляризованная флуоресценция молекул NADH в свободной форме в растворах различной вязкости и полярности и при связывании с ферментом алкогольдегидрогеназа (ADH). Исследования проводились методом поляризационной лазерной спектроскопии с высоким временным разрешением, в рамках которого осуществлялось двухфотонное возбуждение образца фемтосекундными лазерными импульсами, а две ортогонально поляризованные компоненты флуоресценции одновременно регистрировались с помощью системы счета фотонов с временной корреляцией (TCSPC). Была разработана методика анализа сигналов затухания поляризованной флуоресценции, основанная на методе глобальной аппроксимации с использованием алгоритма дифференциальной эволюции.

В рамках выполнения работы были получены следующие важные результаты. Было показано, что свободный NADH в растворе обладает двумя временами жизни флуоресценции и одним временем вращательной диффузии. Для интерпретации этих времен были проведены расчеты *ab initio* структуры NADH, которые показали различие в распределении зарядов в никотинамиде для цис- и транс-конформаций. На основании этого была построена модель, согласно которой наличие двух времен затухания флуоресценции NADH в растворах объясняется различием вероятностей безызлучательных переходов для цис- и транс- конформаций никотинамидной хромофорной группы молекулы NADH. Основываясь на полученных значениях времен вращательной диффузии NADH в водных растворах метанола, был разработан и апробирован принципиально новый метод определения относительных концентраций свернутых (folded) и разложенных (unfolded) конформаций

молекул NADH.

При исследовании комплекса NADH-ADH было обнаружено, что при связывании с ферментом NADH обладает только одним временем затухания флуоресценции. Это время составило 4 нс, что было на порядок больше, чем времена затухания флуоресценции свободного NADH в растворе. Существование только одного времени затухания флуоресценции комплекса NADH-ADH было объяснено на основании модели цис- и транс-конформаций, а именно время затухания флуоресценции комплекса NADH-ADH обусловлено тем, что NADH находится в сайте связывания в единственной транс-конформации. Расчеты *ab initio* показали, что существенное увеличение времени затухания флуоресценции комплекса NADH-ADH возникает за счет уменьшения полярности сайта связывания ферментов по сравнению с водным раствором. При анализе затухания анизотропии флуоресценции комплекса NADH-ADH впервые было определено время анизотропной безызлучательной релаксации с величиной порядка 1 нс. Было сделано предположение, что это время обусловлено поворотом дипольного момента флуоресценции NADH при перестройке ядерной конфигурации в процессе безызлучательной релаксации в возбужденном состоянии.

Исследования, полученные в рамках настоящей работы, являются частью исследовательского проекта, направленного на разработку неинвазивных методик ранней диагностики социально-значимых заболеваний и диагностики клеточных патологий в режиме реального времени. Результаты будут непосредственно использованы для разработки методов мониторинга окислительно-восстановительных реакций в живых клетках, контроля изменений метаболических путей клеток и мониторинга локальной внутриклеточной вязкости.

Список литературы

[1] R. Datta et al, Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications// Journal of

Biomedical Optics, 2020, 25 (7), p 1.

[2] Е. А. Ширшин и др., Многофотонная микроскопия с эндогенным контрастом: природа флуорофоров и возможности в исследовании биохимических процессов // Успехи биологической химии, 2019, 59, с. 139-180.

[3] Ranawat H., Pal S., Mazumder N. Recent trends in two-photon auto-fluorescence lifetime imaging (2P-FLIM) and its biomedical applications // Biomedical Engineering Letters, 2019, 9(3), pp. 293-310.

[4] T. S. Blacker et al Metabolic Profiling of Live Cancer Tissues Using NAD(P)H Fluorescence Lifetime Imaging // Cancer Metabolism: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 2019, 1928, pp 365-387.

[5] Jameson D. M., Hazlett T. L. Time-Resolved Fluorescence in Biology and Biochemistry // Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy / T. G. Dewey, Boston, MA : Springer US, 1991, pp. 105-133.

[6] F. Ariese et al, Time-Resolved Spectroscopy: Instrumentation and Applications // Encyclopedia of Analytical Chemistry, 2017, pp. 1-5.

[7] Lakowicz J. R. Topics in Fluorescence Spectroscopy Volume 5 Nonlinear and Two-Photon-Induced Fluorescence, Springer New York, NY, 2002, pp. 1-544.

[8] T. S. Blacker et al, Activated barrier crossing dynamics in the non-radiative decay of NADH and NADPH // Chemical Physics, 2013, 422, pp. 184-194.

[9] T. S. Blacker et al, Polarized Two-Photon Absorption and Heterogeneous Fluorescence Dynamics in NAD(P)H // Journal of Physical Chemistry B, 2019, 123, 22, pp. 4705-4717.

[10] Krishnamoorthy G., Periasamy N., Venkataraman B. On the origin of heterogeneity of fluorescence decay kinetics of reduced nicotinamide adenine dinucleotide // Biochemical and Biophysical Research Communications, 1987, 144 (1), pp. 387-392.

[11] M. E. Couprie et al, First use of the UV Super-ACO free-electron laser: Fluorescence decays and rotational dynamics of the NADH coenzyme // Review

of Scientific Instruments, 1994, 65(5), pp. 1485-1495.

[12] Wu Y.D., Houk K.N., Theoretical Study of Conformational Features of NAD⁺ and NADH Analogs: Protonated Nicotinamide and 1,4-Dihydronicotinamide // Journal of Organic Chemistry, 1993, 58, pp. 2043-2045.

[13] Edward J. T. Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation // J. Chem. Ed, 1970, 47, pp. 261-270.

[14] Oppenheimer N. J., Arnold L. J., Kaplan N. O. A structure of pyridine nucleotides in solution. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1971, 68(12), pp. 3200-3205.

[15] M. E. Couprie et al, Some Effects of Environment on the Folding of Nicotinamide-Adenine Dinucleotides in Aqueous Solutions // Biochemistry. — 1972, 11 (10), pp. 1920—1930.

[16] Z. Heiner et al, Kinetics of Light-Induced Intramolecular Energy Transfer in Different Conformational States of NADH // Journal of Physical Chemistry B., 2017, 121(34), pp. 8037—8045.

[17] Hull R. V., Conger P. S., Hoobler R. J. Conformation of NADH studied by fluorescence excitation transfer spectroscopy // Biophysical Chemistry, 2001, 90 (1), pp. 9-16.

[18] Visser A. J., Hoek A. van. The fluorescence decay of reduced nicotinamides in aqueous solution after excitation with a UV-mode locked Ar ion laser // Photochemistry and Photobiology, 1981, 33(1), pp. 35-40.

[19] S. Cao et al, A fraction of NADH in solution is “dark”: Implications for metabolic sensing via fluorescence lifetime // Chemical Physics Letters, 2019, 726, pp. 18—21.

[20] H. D. Vishwasrao et al, Conformational dependence of intracellular NADH on metabolic state revealed by associated fluorescence anisotropy // Journal of Biological Chemistry, 2005, 280 (26), pp. 25119-25126.

[21] Ladokhin A. S., Brand L. Evidence for an excited-state reaction contributing to NADH fluorescence // Journal of Fluorescence, 1995, 5(1), pp. 99—106.

[22] R. Piersma et al, Optical spectroscopy of nicotinoprotein alcohol dehydrogenase from *Amycolatopsis methanolica*: A comparison with horse liver alcohol dehydrogenase and UDP-galactose epimerase// *Biochemistry*, 1998, 37 (9), pp. 3068—3077.