



УДК 577.336

## ВЫСВОБОЖДЕНИЕ FAD ПРИ ЛОКАЛЬНОМ КОНФОРМАЦИОННОМ ПЕРЕХОДЕ, ИНДУЦИРУЕМОМ ТРИМЕТИЛАМИНДЕГИДРОГЕНАЗОЙ В ЭЛЕКТРОНТРАНСПОРТНОМ ФЛАВОПРОТЕИНЕ

© 2004 г. А. С. Ломтев<sup>#</sup>, А. Г. Бобров, Н. Л. ВекшинИнститут биофизики клетки РАН,  
142290, г. Пущино, Московская обл.

Поступила в редакцию 03.02.2003 г. Принята к печати 28.04.2003 г.

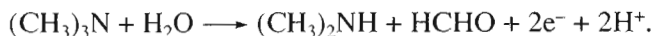
Изучена *in vitro* пара электронпереносящих белков: триметиламиндегидрогеназа (TMAD) и электронтранспортный флавопротеин (ETF) из бактерий *Methylophilus methylotrophus*. Методом флуоресцентной спектроскопии обнаружено, что флавинадениндинуклеотид (FAD) способен медленно спонтанно высвобождаться из ETF. Такое высвобождение сопровождается увеличением флуоресценции. В условиях достаточной ионной силы (0.1 М NaCl или 50 мМ фосфат) высвобождение FAD резко активируется препаратами TMAD, индуцирующими локальный конформационный переход в ETF. На основании величин триптофановой поляризации и времени жизни с помощью уравнения Левшина–Перрена показано, что после смешивания белков не происходит изменений размеров белковых частиц, т.е. сами по себе TMAD и ETF не образуют друг с другом устойчивого комплекса. В присутствии триметиламина или формальдегида в смеси белков высвобождения флавина из ETF не происходило. Вероятно, в этом случае между белками формировался прочный комплекс с участием формальдегида. При кратковременной инкубации ETF с феррицианидом происходил гидролиз FAD до флавинмононуклеотида (FMN) и AMP. Это позволяет объяснить, почему ранее в препаратах ETF исследователи обнаруживали AMP. Предложен флуоресцентный метод, позволяющий с использованием этиленгликоля отличать в растворе FAD от FMN.

*Ключевые слова:* триметиламиндегидрогеназа, электронтранспортный флавопротеин, конформационный переход, FMN, FAD, триптофан, флуоресценция.

### ВВЕДЕНИЕ

Триметиламиндегидрогеназа (TMAD) и электронтранспортный флавопротеин (ETF) из бактерий *Methylophilus methylotrophus* являются водорастворимыми белками, которые в физиологических условиях способны образовывать специфический комплекс для электронного переноса [1–5].

TMAD представляет собой железосерный флавопротеин, который катализирует окисление триметиламина до диметиламина и формальдегида:



Этот белок – гомодимер, каждая субъединица которого содержит FMN, ковалентно связанный через остаток цистеина, и бактериальный ферродоксинаподобный 4Fe/4S-центр [1, 3].

Считается, что ETF, физиологический акцептор электронов от TMAD, – это гетеродимер, содержащий нековалентно связанные молекулы FAD и AMP. Молекула FAD акцептирует электроны от

железосерного кластера TMAD (с участием остатка  $\text{Cys}^{442}$  TMAD) и восстанавливается при этом до семихинонной формы. Функция AMP в ETF не известна [1].

Ряд данных был интерпретирован ранее [1–4] в пользу того, что TMAD может индуцировать в ETF крупномасштабный конформационный переход. Однако не ясно, на сколько же на самом деле он масштабен и действительно ли такой переход служит абсолютно необходимым “физиологическим атрибутом” образования комплекса [5]. Перенос электронов между указанными белками происходит очень быстро. В то же время хорошо известно, что масштабные конформационные переходы – это медленные процессы. Более того, при функционировании различных электронпереносящих комплексов зачастую не обнаруживается каких-либо масштабных изменений структуры при переходах между окисленной и восстановленной формами белков или при связывании субстратов. Это показано с помощью рентгеноструктурного анализа, например, для цитохрома с [6] и алкогольдегидрогеназы [7]; все изменения затрагивают только активный центр и по масштабу не превышают 1 Å. Вместе с тем,

Сокращения: ETF – электронтранспортный флавопротеин; FAD – флавинадениндинуклеотид; FMN – флавинмононуклеотид; TMAD – триметиламиндегидрогеназа.

<sup>#</sup>Автор для переписки (тел.: (095) 923-74-67 доб. 2-92; эл. почта: nvekshin@rambler.ru).

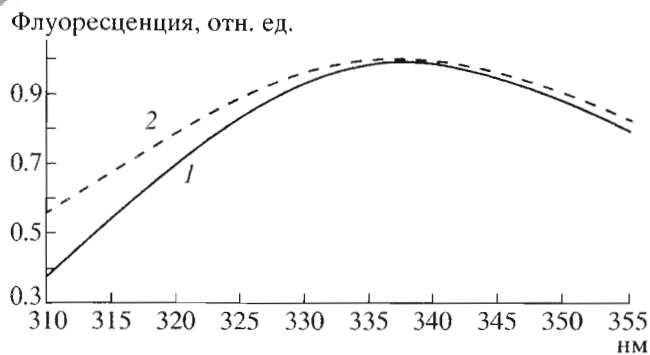


Рис. 1. Нормированные спектры излучения TMAD (1) и ETF (2) в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7.2). Длина волны возбуждения – 280 нм. Температура 13°C.

нельзя исключить, что конформационное поведение редокс-ферментов в растворе может существенно отличаться от конформаций в кристалле.

Кристаллы комплекса между TMAD и ETF до сих пор получить не удалось. Поэтому о возможности масштабных конформационных переходов при образовании комплекса пока говорят только данные малоуглового рентгеновского рассеяния [4].

Цель данной работы – изучение конформационных свойств TMAD и ETF отдельно и в их смеси с помощью флуоресцентной спектроскопии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В TMAD содержится 30 остатков триптофана и 62 тирозина, а в ETF – соответственно 4 и 14 [1]. Поскольку молярный коэффициент поглощения триптофана при 280 нм почти в 6 раз выше, чем тирозина, то главный вклад в поглощение и излучение каждого из белков дают именно триптофановые остатки. Мы показали, что максимум спектра триптофанового излучения как ETF, так и TMAD лежит при 337 нм (рис. 1), т.е. он сдвинут на 18 нм в коротковолновую сторону по сравнению с максимумом спектра излучения водного триптофана (в наших условиях – 355 нм). Такое положение полосы излучения означает, что большинство триптофановых остатков в обоих белках находится внутри глобулы и не контактирует

Таблица 1. Степень поляризации ( $P$ ) и время жизни триптофанового излучения белков ( $\tau$ ) отдельно и в их смеси, а также найденные по уравнению Левшина–Перрена размеры частиц

Белок	$P$	$\tau$ , нс	$V$ , Å <sup>3</sup>	$d$ , Å
ETF	$0.29 \pm 0.01$	$3.8 \pm 0.1$	~24000	35.8
TMAD	$0.30 \pm 0.01$	$3.1 \pm 0.1$	~22000	34.7
ETF + TMAD	$0.30 \pm 0.01$	$3.5 \pm 0.1$	~24800	36.2

Примечание: концентрация белков ~ 2 мкМ.

с водной фазой [8]. Вообще говоря, положение максимума спектра флуоресценции отражает не столько точную долю триптофановых остатков в гидрофобном или полярном окружении, сколько относительный вклад излучения этих остатков в суммарный спектр белка. Но при этом, однако, относительный вклад излучения этих остатков в суммарный спектр белка определяется не только полярностью остатков триптофана, находящихся в полярном окружении, но и их долей. Для обоих белков из PCA известно (Protein Data Bank), что их триптофановые остатки находятся внутри глобулы (т.е. не обращены в водную фазу) и что сильно полярных групп около большинства этих остатков нет. Поэтому небольшие вариации в квантовых выходах отдельных триптофановых остатков здесь существенной роли не играют. При нормировке спектров видна (в коротковолновой области) тирозиновая компонента ETF (рис. 1). При смешивании TMAD с ETF не наблюдалось каких-либо спектральных сдвигов, что говорит об отсутствии масштабных конформационных изменений белков. Причем, основной вклад в триптофановую флуоресценцию эквимольной смеси белков вносил TMAD.

Фазово-модуляционным методом [8, с. 62] мы нашли, что среднее время жизни электронно-возбужденного состояния остатков триптофана в TMAD равно 3.1, а в ETF – 3.9 нс (табл. 1). Нельзя исключить, что причиной некоторого укорочения возбужденных триптофилов в TMAD по сравнению с ETF является перенос энергии на железосерный кластер (и на цистеинил-FMN). Укорочение времени жизни не обязательно вызвано переносом энергии. Но, в принципе, перенос (резонансный или нерезонансный) обязан быть [8]. Практически во всех известных железопротеинах триптофановое время жизни укорочено [9].

Степень поляризации триптофанового излучения TMAD и ETF составляла 0.30 и 0.29 соответственно. Такие достаточно высокие значения поляризации (предельная поляризация замороженного триптофана равна 0.42 [8]) означают, что триптофановые остатки не обладают свободным вращением. Деполяризация триптофановой флуоресценции небольших белков в водных растворах происходит главным образом из-за вращения самих белковых глобул [8]. В молекулах TMAD и ETF вращением индольных колец в первом приближении можно пренебречь, так как практически все их триптофаны плотно упакованы внутри глобул. Более подробно вопрос об интерпретации поляризационных данных рассмотрен в работе [8].

Эффективные диаметры вращающихся сферических частиц (найденные с помощью уравнения Левшина–Перрена [8, с. 63]) в растворах ETF или TMAD отдельно и в их смеси оказались почти одинаковыми (табл. 1). Если бы между двумя

белками формировался стабильный комплекс (с масштабными конформационными изменениями), то поляризация должна была бы возрасти, так как средний объем частиц становился бы больше. Если подставить усредненное время жизни и сумму объемов двух белков в уравнение Левшина–Перрена, то триптофановая поляризация для комплекса должна быть не менее 0.34. В действительности же для смеси двух белков мы получили поляризацию 0.3. Эта величина практически не отличается от значений поляризации отдельных белков. Таким образом, средний размер частиц в смеси не увеличился. Это может быть в двух случаях: а) белки имеют практически независимое поведение, т.е. они не формируют прочного комплекса; б) один из белков связывается в большой полости внутри другого. Второй случай вряд ли реализуется, так как по рентгеноструктурным данным ни в одном из белков не обнаружено сколько-нибудь заметной полости [3].

Если бы образование комплекса сопровождалось масштабными конформационными изменениями, это должно было бы отразиться на поляризации и времени жизни триптофанового излучения. Однако, как видно из табл. 1, этого не наблюдается. Таким образом, полученные данные не обнаруживают ни прочного комплекса (имеющего существенно иную структуру, чем отдельные белки), ни масштабных конформационных переходов в самих белках.

При смешивании ETF и TMAD триптофановая флуоресценция была аддитивна, т.е. составляла сумму интенсивностей излучения белков по отдельности. В ходе длительной инкубации (в течение 2 ч) эта интенсивность была постоянна. Поляризация триптофановой флуоресценции (0.3) и время жизни (3.5 нс), измеряемые в инкубируемой смеси, тоже были неизменны. Оба указанных параметра практически не отличаются от среднеарифметических значений для этой пары белков. Это еще раз подтверждает, что при смешивании и последующей совместной инкубации белков не происходит их существенных структурных изменений, а значит – вряд ли образуется устойчивый комплекс.

Квантовый выход излучения свободного FMN в воде составляет около 0.2 [8], для флавина TMAD эта величина в несколько раз меньше [5]. Это означает, что фотовозбужденный цистеинил-FMN в TMAD чем-то эффективно дезактивируется. По-видимому, тушителем является близко расположенный железосерный кластер, что можно предположить из известной РСА-структуры белка. С другой стороны, время жизни было достаточно большим ~6 нс (табл. 2); что даже больше, чем время жизни свободного FMN в воде – 5 нс. Это означает, что дезактивация возбужденного цистеинил-FMN происходит не динамическим пу-

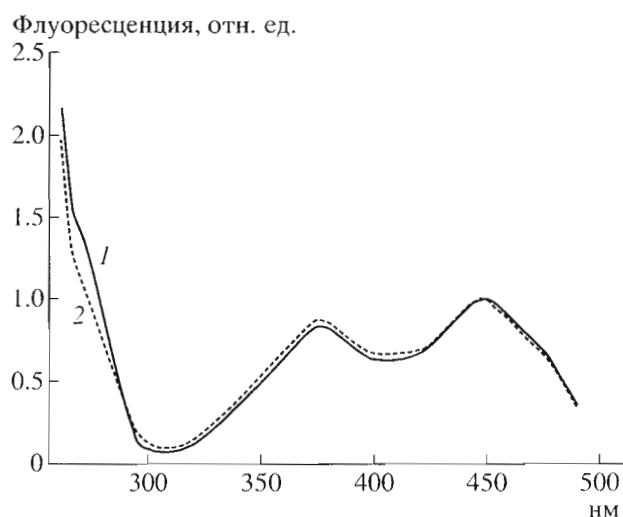
**Таблица 2.** Степень поляризации и время жизни флавинового излучения

	<i>P</i>	$\tau$ , нс
ETF	$0.03 \pm 0.01$	$5.0 \pm 0.1$
TMAD	–	$\sim 6 \pm 1$
ETF + TMAD	$0.03 \pm 0.01$	$5.0 \pm 0.1$
Свободный FAD	$0.02 \pm 0.01$	$2.5 \pm 0.2$
Свободный FMN	$0.01 \pm 0.01$	$5.0 \pm 0.1$

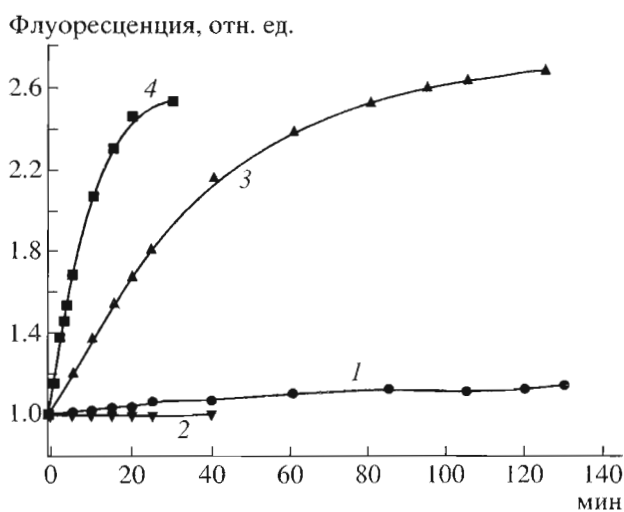
тем (возможным при конформационных флуктуациях белка в наносекундном временном диапазоне), а носит статический характер, т.е. осуществляется какой-то соседней группой мгновенно, в субнаносекундном диапазоне.

Флавиновая флуоресценция ETF гораздо сильнее, чем TMAD. При этом она существенно деполаризована:  $P = 0.03$  (табл. 2). Следовательно, флавиновая часть FAD (или вся молекула FAD) вращается свободно. Такое свободное вращение может происходить только в жидкой фазе, но не внутри белковой глобулы. Время жизни FAD в ETF составляет 5 нс (табл. 2). Это в 2 раза больше, чем у свободного FAD в воде ~2.5 нс. Отсюда следует, что аденозиновый фрагмент молекулы FAD фиксирован в глобуле и не тушит флавиновую часть структуры, контактирующую с водной фазой.

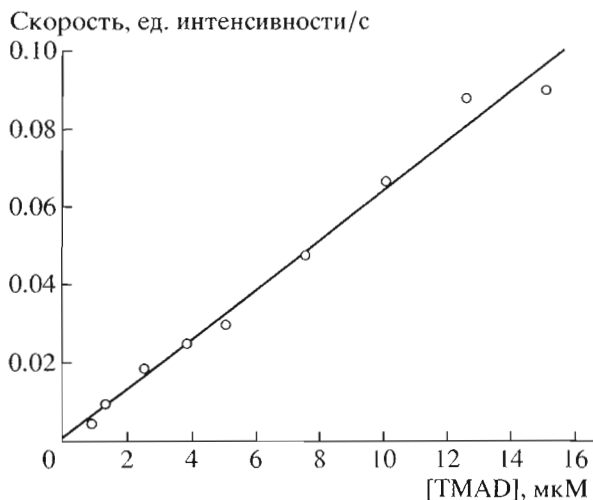
Спектр возбуждения FAD в ETF почти совпадает со спектром возбуждения свободного FAD. При этом, как видно из рис. 2, полоса Trp + Tug при 280 нм не обнаруживается; интенсивность при 280 нм в случае ETF даже несколько меньше, чем в случае свободного FAD. Это означает



**Рис. 2.** Спектр возбуждения флавиновой флуоресценции ETF (2) и свободного FAD (1) в 20 мМ Трис-НСl (рН 7.5). Флавиновая флуоресценция регистрировалась при 510 нм. Температура 20°C.



**Рис. 3.** Зависимость интенсивности флуоресценции от времени для свободных ETF (1), TMAD (2) и их смеси (3) (при 13°C, в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7.2), а также ETF в присутствии 10 мкМ феррицианида (20 мМ Нерес, pH 7.0, 20°C) (4).  $\lambda_{\text{возб}}$  – 450 нм,  $\lambda_{\text{изл}}$  – 520 нм. Концентрации: ETF – 2.1, TMAD – 1.5 мкМ.



**Рис. 4.** Зависимость скорости возрастания флуоресценции ETF (5 мкМ) от концентрации TMAD.

отсутствие резонансного переноса с Trp и Tug на FAD. Отсюда можно заключить, что флуоресцентная часть FAD располагается далеко от триптофановых и тирозиновых остатков, находящихся в глубине глобулы.

Оказалось, что в растворах с достаточной ионной силой (0.1 М NaCl или 50 мМ фосфат) FAD способен медленно спонтанно высвобождаться из ETF. Это высвобождение сопровождается увеличением флуоресценции (рис. 3). Отсюда следуют два вывода: (1) фотовозбужденное

состояние FAD в белке чем-то тушится (вероятно, согласно рентгеновской структуре – ближайшими остатками Arg<sup>237</sup>, Gly<sup>37</sup>, Ser<sup>254</sup> и Leu<sup>13</sup> [1]); (2) FAD связан с белком очень непрочно. Можно предположить, что спонтанное медленное высвобождение FAD возникает в результате локальных структурных флуктуаций белка.

Высвобождение FAD из ETF резко активируется препаратами TMAD. Так, двухчасовая инкубация смеси белков – ETF (2.1 мкМ) и TMAD (1.5 мкМ) в 20 мМ Трис-НСl в присутствии 0.1 М NaCl (pH 7.5) или в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7.2) приводила к увеличению интенсивности общей флуоресценции в 2.6 раза (рис. 3). Поскольку квантовый выход флуоресценции TMAD во много раз ниже, чем ETF, то в смеси двух белков подавляющий вклад в суммарное флуоресцентное излучение дает именно ETF.

Полученная линейная зависимость возрастания флуоресценции ETF от концентрации TMAD при малых и избыточных количествах TMAD (рис. 4) говорит о том, что взаимодействие между белками носит динамический характер. При таком взаимодействии конформационные изменения в ETF не могут быть масштабными, а должны носить локальный характер.

Увеличение интенсивности флуоресценции в смеси белков не наблюдалось в трех случаях: а) при низкой ионной силе (без NaCl) – в 20 мМ Трис-НСl, pH 7.5; б) при малых концентрациях ETF (0.21 мкМ) и TMAD (0.15 мкМ); в) при добавлении субстрата – триметиламина (100 мкМ) (данные не приведены).

Наибольший интерес, на наш взгляд, представляет отсутствие увеличения интенсивности флуоресценции при добавлении триметиламина. Схожий эффект мы получили при добавлении такого же количества формальдегида – продукта реакции, катализируемой TMAD (данные не приведены). В контроле триметиламин или формальдегид, добавленные к раствору ETF, не влияли на спонтанное высвобождение FAD. Отсюда можно сделать предположение, что комплекс между TMAD и ETF образуется с помощью формальдегида, образующегося в ходе ферментативной реакции окисления триметиламина. Формальдегид, как известно, способен сшивать между собой любые белки. По-видимому, химическое сшивание формальдегидом TMAD с ETF может предотвращать высвобождение FAD из ETF. Вероятно таков механизм образования прочного комплекса. Детектировать такой комплекс по триптофановой флуоресценции вряд ли возможно из-за экранирования УФ-света формальдегидом [10].

Препараты ETF обычно проходят обработку феррицианидом для перевода белка из семихионной формы в полностью окисленную [1–4]. В на-

ших опытах при добавлении 2 мкМ феррицианида скорость восстановления  $\text{ETF}_{\text{ox}}$  препаратами TMAD (в присутствии триметиламина) не изменялась. Это означает, что феррицианид не является посредником при переносе электрона с TMAD на ETF. Никаких окислительно-восстановительных процессов в триаде ETF–феррицианид–TMAD мы не наблюдали.

При 10-минутной инкубации ETF с феррицианидом имело место двукратное увеличение флуоресценции (рис. 3). Причиной этого могло являться высвобождение FAD из белка или гидролиз FAD феррицианидом до FMN и AMP. Однако в контроле свободный FAD феррицианидом не гидролизировался. На профиле элюции ETF с сефадекса G-25, уравновешенного 20 мМ Трис-НСl (рН 7.5), в обоих случаях (с феррицианидом и без него) видны два флуоресцентных пика (рис. 5). Первый пик принадлежит FAD, связанному с белком. В отсутствие феррицианида второй пик – это свободный FAD. В случае смеси ETF–феррицианид второй пик – это FMN, высвободившийся после гидролиза белкового FAD. В первом случае отношение флуоресценции флавина, связанного с ETF, к свободному флавинолу составляет 1 : 2.2, а во втором – 1 : 5.5.

Появление свободного FMN в результате гидролиза белкового FAD феррицианидом было подтверждено разработанным нами методом, основанным на взаимодействии с этиленгликолем, который позволяет отличить FAD от FMN в растворе (рис. 6). Этиленгликоль формирует стабильный комплекс с FAD и поэтому предотвращает внутримолекулярную динамическую дезактивацию фото-возбужденного хромофора аденозиновой частью. Например, в 40%-ном этиленгликоле флуоресценция FAD возрастает вдвое, а флуоресценция FMN не изменяется (рис. 6).

Итак, феррицианид индуцирует гидролиз FAD в ETF (но не индуцирует гидролиз свободного FAD). Полученные результаты позволяют нам предположительно объяснить неизвестную функцию AMP в ETF. Не исключено, что нативная димерная форма фермента содержит изначально не одну, а две молекулы FAD, одна из которых может гидролизироваться феррицианидом, применяемым для перевода белка из семихинонной формы в полностью окисленную. Если это так, то процедура выделения и обработки белковых препаратов должна быть существенно модифицирована.

Подытоживая полученные результаты, можно сделать следующее заключение. При инкубации ETF с феррицианидом происходит гидролиз FAD до FMN и AMP. Это позволяет нам объяснить, почему ранее в препаратах ETF исследователи обнаруживали AMP [1–5]. Кроме того, молекула FAD способна медленно спонтанно высвобождаться из ETF. Высвобождение FAD из белка неизбежно

Флуоресценция, отн. ед.

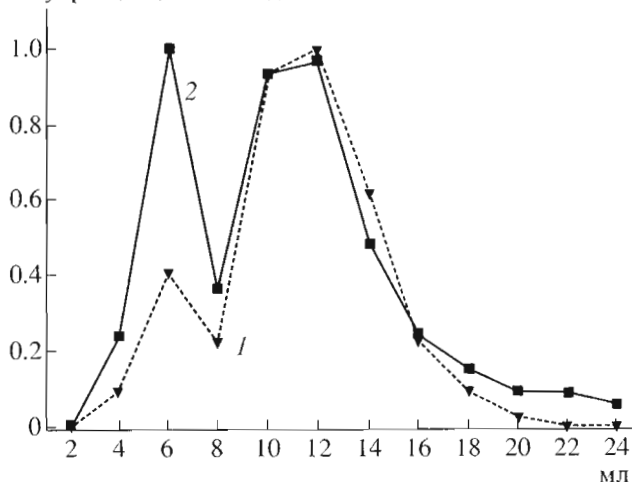


Рис. 5. Нормированные на максимум профили элюции ETF в присутствии (1) и в отсутствие (2) феррицианида. Сефадекс G-25 уравновешен 20 мМ Трис-НСl (рН 7.5). Опытный образец до элюции был инкубирован 30 мин с 10 мкМ феррицианидом (при 4°C).

$I_{\lambda}$ , отн. ед.

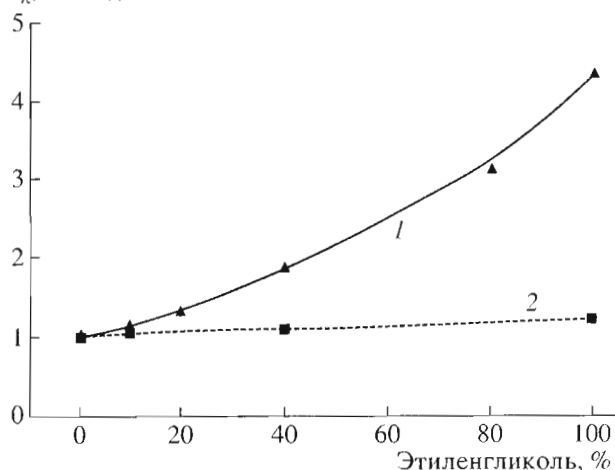


Рис. 6. Зависимость интенсивности флуоресценции FAD (1) и FMN (2) в воде от содержания этиленгликоля. Температура 20°C.

сопровождается изменением конформации в той области белка, где исходно находился FAD. Высвобождение FAD резко активируется препаратами TMAD, индуцирующими локальный конформационный переход в ETF. Судя по данным триптофановой флуоресценции, никаких масштабных конформационных переходов при этом не возникает. В отсутствие триметиламина (когда формальдегид не образуется) белки не образуют друг с другом устойчивого комплекса. Триметиламин (или формальдегид) в смеси белков препятствует высвобождению флавина из ETF. Можно предпо-

ложить, что в этом случае между белками формируется прочный комплекс с участием формальдегида. Это будет изучено впоследствии.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Измерения флуоресценции проводились в 20 мМ Трис-НСl (рН 7.5) в присутствии или в отсутствие 0.1 NaCl или в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7.2) на фазово-модуляционном спектрофлуориметре "SLM-4800" (SLM Inc., США) в зеркальных кюветках [8, 11], увеличивающих сигнал в несколько раз.

Флуоресценцию флавинов и остатков триптофана возбуждали при 450 и 280 нм соответственно, а детектировали при 520 и 340 нм соответственно. Спектры излучения (некорректированные) и спектры возбуждения (корректированные) регистрировали с шагом 2 нм в режиме "отношение". Степень поляризации триптофанового излучения определяли на длине волны 340 нм (возбуждение – 300 нм), а флавинового – 520 нм (возбуждение – 480 нм).

Флуоресцентное время жизни хромофоров измеряли фазово-модуляционным методом при частоте модуляции 30 МГц.

Вычисление объема и диаметра молекул TMAD и ETF выполняли по уравнению Левшина–Перрена [8] на основании данных по поляризации и времени жизни триптофанового излучения этих белков при 13°C. Уравнение имеет вид:

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left( \frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \left( 1 + \frac{RT\tau}{\eta V} \right).$$

Здесь  $P_0$  – предельная поляризация (составляет 0.42 для триптофана в замороженных растворителях [8]),  $P$  – измеренная поляризация,  $\tau$  – время жизни,  $\eta$  – вязкость раствора (0.012 пуаз для воды при 13°C),  $T$  – абсолютная температура (286 К),  $R$  – универсальная газовая постоянная и  $V$  – эффективный объем частицы.

ETF выделяли из клеток по методике, описанной в работе [2], причем белок ETF содержал полувосстановленный FAD (т.е. FAD в семихинон-ной форме), что определялось по характерному спектру поглощения. Для получения ETF<sub>ок</sub> (окисленная форма) препарат ETF обрабатывали в течение 30 мин раствором 10 мкМ феррицианида при 4°C и затем пропускали через колонку G-25 (длиной 40 см) для удаления феррицианида. Белок и свободный феррицианид выходили отдельными пиками. Разделение ETF от свободного флавина и феррицианида выполняли с помощью

эксклюзионной хроматографии на геле G-25, уравновешенным 20 мМ Трис-НСl (рН 7.5). На колонку наносилось 30 мкл исходного раствора 42 мкМ ETF (контроль) или ETF (опыт). Элюат собирали по 2 мл и флуориметрировали по триптофану и флавину.

Концентрацию белков определяли спектрофотометрически с учетом молярных коэффициентов поглощения при 280 нм: для TMAD – 266400, а ETF – 57600 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>. Молярные коэффициенты поглощения были получены сложением коэффициентов всех триптофановых и тирозиновых остатков, количество которых известно в каждом белке. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре "M-40" (Zeiss, Германия).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны проф. Найджелу Скрутону за плодотворные дискуссии и предоставление нескольких белковых препаратов, а также Мэтью Джонсу за участие в измерении концентрации зависимости. А.С. Ломтев и А.Г. Бобров благодарят FEBS за финансирование визитов в Лестерский университет.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Scrutton N.S., Basran J., Wilson E.K., Chohan K.K., Jang M.-H., Sutcliffe M.J., Hille R.* // Biochemical Society Transactions. 1999. V. 27. P. 196–201.
2. *Talfournier F., Munro A.W., Basran J., Sutcliffe M., Daff S., Chapman K.S., Scrutton N.S.* // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 20190–20196.
3. *Wilson E. K., Huang L., Sutcliffe M. J., Mathews F.S., Hille R., Scrutton N.S.* // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 41–48.
4. *Jones M., Basran J., Sutcliffe M., Grossmann J.G., Scrutton N.S.* // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 21349–21354.
5. *Jones M., Talfournier F., Bobrov A., Grossmann J.G., Vekshin N., Sutcliffe M., Scrutton N.S.* // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 8457–8465.
6. *Takano T., Dikerson R.E.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 6371–6378.
7. *Cedergren-Zeppezauer E.S., Andersson I., Ottonello S., Bignetti E.* // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 4000–4010.
8. *Vekshin N.L.* Photonics of Biopolymers. Berlin: Springer, 2002.
9. *Dorovska-Taran V., van Hoek A.* // FEBS Lett. 1994. V. 348. P. 305–310.
10. *Барлтрон Дж., Коил Дж.* Возбужденные состояния в органической химии. М.: Мир, 1978. С. 17–18.
11. *Векшин Н.Л.* // Оптическая техника. 1994. № 3. С. 18–20.

## The Release of Flavin Adenine Dinucleotide upon a Local Conformational Transition in Electron-Transferring Flavoprotein Induced by Trimethylamine Dehydrogenase

A. S. Lomtev<sup>#</sup>, A. G. Bobrov, and N. L. Vekshin

<sup>#</sup> Phone: +7 (095) 923-7467, e-mail: nvekshin@rambler.ru

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,

Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

The electron-transferring proteins, trimethylamine dehydrogenase (TMAD) and electron-transferring flavoprotein (ETF) from the bacterium *Methylophilus methylotrophus*, were studied *in vitro* by fluorescence spectroscopy. Flavin adenine dinucleotide (FAD) was found to be capable of a slow and spontaneous release from ETF, which is accompanied by an increase in flavin fluorescence. At a rather high ionic strength (0.1 M NaCl or 50 mM phosphate), the FAD release is sharply activated by TMAD preparations that induce a local conformational transition in ETF. The values of tryptophan fluorescence polarization and lifetime and the use of the Levshin–Perrin equation helped show that the size of protein particles remain unchanged upon the TMAD and ETF mixing; i.e., these proteins themselves do not form a stable complex with each other. The protein mixture did not release flavin from ETF in the presence of trimethylamine and formaldehyde. In this case, a stable complex between the proteins appeared to be formed under the action of formaldehyde. Upon a short-term incubation of ETF with ferricyanide, FAD was hydrolyzed to flavin mononucleotide (FMN) and AMP. This fact explains the previous detection of AMP in ETF preparations by some researches. A fluorescence method was proposed for distinguishing FAD from FMN in solution using ethylene glycol. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* conformational transition, electron-transferring flavoprotein, FAD, fluorescence, FMN, trimethylamine dehydrogenase, tryptophan