

## МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ И NAD(P)H:FMN-ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

Коваль А.А.,

научные руководители: д-р биол. наук, проф., Кратасюк В.А., канд. физ.-мат.  
наук Немцева Е.В., PhD, проф. Ульманн М.Г.

Сибирский федеральный университет

В основе свечения бактерий лежит биохемилюминесцентная реакция, катализируемая специальным ферментом – бактериальной люциферазой (Рис. 1). В ходе этой реакции происходит окисление восстановленного флавинмоноклеотида (FMNH<sub>2</sub>) и алифатического альдегида (RCHO) кислородом воздуха (O<sub>2</sub>). Однако ни один из субстратов люциферазы не может существовать в клетке в свободном виде: FMNH<sub>2</sub> подвержен быстрому автоокислению, а альдегид является ядом и не накапливается в клетках бактерий. Считается, что эффективная работа люциферазы обеспечивается сопряжением с другими ферментами. Альдегид поставляется комплексом восстановления карбоновой кислоты, состоящим из трансферазы, синтетазы и редуктазы. Восстановление FMN осуществляет NAD(P)H-зависимая оксидоредуктаза. Скоординированная работа биолуминесцентной системы бактерий, как и других полиферментных систем, предполагает взаимодействие между ферментами и образование белок-белковых комплексов.

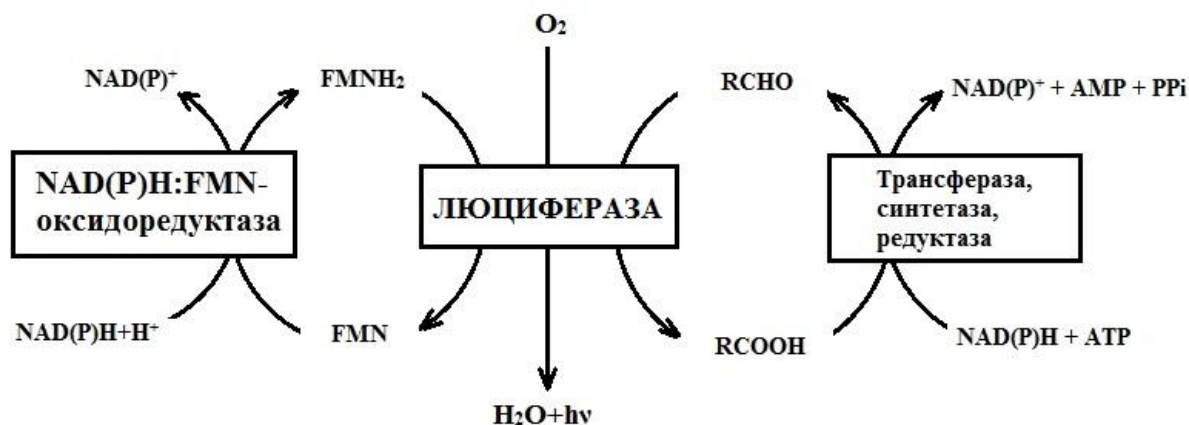


Рис. 1. Сопряжение ферментов биолуминесцентной системы бактерий.

Для получения стабильного свечения *in vitro* широко используют биферментную систему NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза-бактериальная люцифераза. При этом вопрос, образуют ли эти два фермента комплекс, в настоящее время не решен однозначно. Существуют как экспериментальные свидетельства существования взаимодействия между бактериальной люциферазой и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой [1-3], так и доказательства их независимой работы [4]. Полученные не так давно данные о кристаллической структуре люциферазы и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы из морских бактерий *Vibrio harveyi* позволяют проанализировать возможность образования комплекса между ними с точки зрения трехмерного строения этих макромолекул.

Целью данного исследования являлось определение структурных предпосылок для образования комплекса с прямым переносом восстановленного флавинмоноклеотида между NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой и бактериальной люциферазой методами электростатики непрерывной среды и молекулярного докинга.

Работа была проведена в лаборатории биоинформатики университета г. Байройт (Германия). Объектом исследований служили кристаллические структуры бактериальной люциферазы *Vibrio harveyi* (PDBID: 3FGC) и NADPH:FMN-оксидоредуктазы *Vibrio harveyi* (PDBID: 2BKJ). Предварительно структуры были подготовлены для молекулярного докинга (определены недостающие аминокислоты, проведено их моделирование в программе MODELLER [5]). Затем проводили титрование и определение протонированных состояний полярных аминокислот при помощи программы MEAD [6]. Оптимизация измененной структуры производилась при помощи пакета CHARMM [7].

Метод, используемый в данной работе, основан на теории среднего поля Пуассона-Больцмана. В данном методе белок имеет фиксированную структуру, его атомы представляют собой точечные заряды, между которыми возможно только кулоновское взаимодействие. Электростатическое поле белка является совокупностью электростатических полей всех его атомов и полностью определяется потенциалом, который можно численно найти из уравнения Пуассона-Больцмана [8]. При этом белок обладает низкой диэлектрической проницаемостью  $\epsilon$ , в то время как окружающий водный раствор моделируется сплошной средой с  $\epsilon = 80$ . Растворенные в окружающей воде ионы представлены в виде плотности заряда, отвечающей распределению Больцмана. В данной работе для определения электростатического потенциала исследуемых белков использовалась программа APBS [9]. Преимущество данного метода состоит в том, что он позволяет описывать и исследовать белковые молекулы на атомном уровне, учитывая при этом влияние растворителя, который моделируется как непрерывная среда. Такой подход к описанию окружающей белок среды позволяет учесть ее влияние, значительно снижая машинное время, затрачиваемое на расчет взаимодействия большого числа молекул растворителя друг с другом и растворенным белком.

Таким образом, для исследуемых структур была рассчитана величина электростатического потенциала, которую в дальнейшем использовали для нахождения комплекса с минимальной энергией методом Монте-Карло в программе MCDOCK [10]. Для поиска конфигурации с минимальной энергией задавали начальное расположение белков, затем один белок двигали в электростатическом поле другого белка, и выбирали конфигурацию согласно критерию Метрополиса. Среди полученных комплексов для анализа были выбраны десять, обладающих наименьшей энергией.

Анализ полученных конфигураций показал, что бактериальная люцифераза либо не образует комплекса с NADPH:FMN-оксидоредуктазой, либо этот комплекс является нестабильным, на что указывает плотность вероятности нахождения оксидоредуктазы относительно люциферазы. Только для одной из десяти конфигураций возможен прямой перенос FMNH<sub>2</sub> от NADPH:FMN-оксидоредуктазы к люциферазе (Рис. 2). Для получения такого комплекса были удалены подвижные петли, которые вероятно выполняют функцию фиксации субстрата внутри активного центра и при взаимодействии ферментов должны открывать доступ к активному центру. Для люциферазы это GLY 284, HIS 285, LYS 286, ASP 287, THR 288, ASN 289 (на  $\alpha$ -субъединице). Для оксидоредуктазы это ALA 201, SER 202, ARG 203, THR 204, SER 205, ASN 206, GLN 207, LYS 208, LEU 209 (на обеих субъединицах).

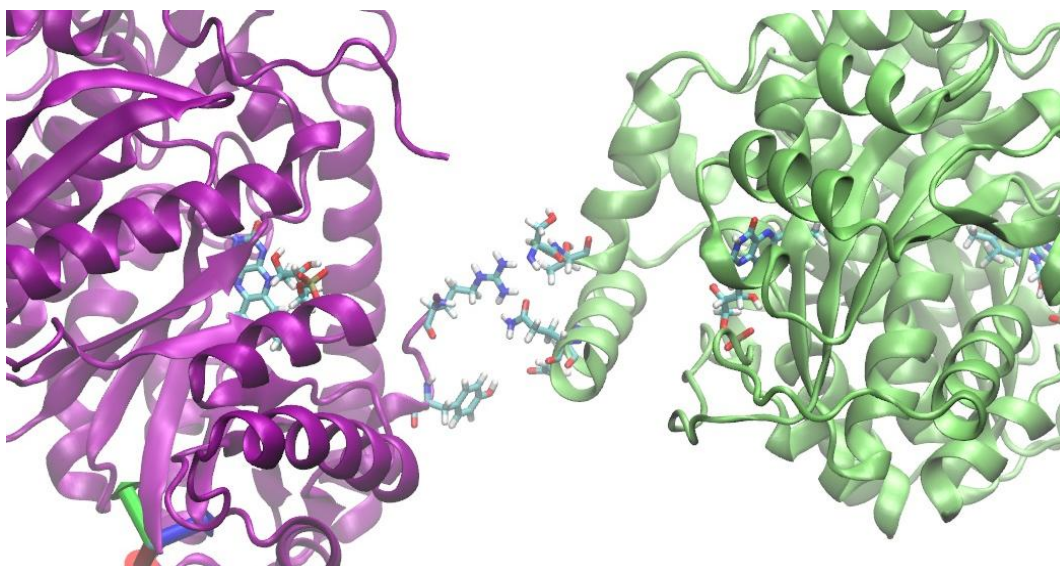


Рис. 2. Фрагмент комплекса бактериальной люциферазы (слева) и NADPH:FMN-оксидоредуктазы (справа), в котором возможен прямой перенос FMNH<sub>2</sub>.

На рисунке 2 также изображены наиболее близко расположенные аминокислотные остатки двух исследованных белков (расстояние менее 5 Å). Удаленность атомов друг от друга (таблица 1) указывает на то, что формирование водородной связи возможно лишь между атомом Н<sup>η11</sup>ARG 291 бактериальной люциферазы и О<sup>ε1</sup>GLN 197 оксидоредуктазы. В случае существования белок-белкового комплекса данные аминокислоты должны играть ключевую роль в его стабилизации, что является предметом дальнейшего анализа.

Таблица 1. Расстояние между атомами аминокислотных остатков, которые могут принимать участие в стабилизации белок-белкового комплекса.

Люцифераза (3FGC)			Оксидоредуктаза (2BKJ)			Å
Атом	Аминокислота	№	Атом	Аминокислота	№	
Н <sup>η12</sup>	ARG	291	Н <sup>ε21</sup>	GLN	197	1.68
Н <sup>η11</sup>	ARG	291	О <sup>ε1</sup>	GLN	197	1.92
Н <sup>η22</sup>	ARG	291	Н <sup>γ21</sup>	THR	211	2.37
Н <sup>η11</sup>	ARG	291	Н <sup>γ22</sup>	THR	211	3.08
Н <sup>η22</sup>	ARG	291	Н <sup>σ</sup>	SER	210	3.19
Н <sup>η</sup>	TYR	294	О <sup>ε1</sup>	GLN	194	3.34
Н <sup>ε2</sup>	TYR	294	О <sup>ε1</sup>	GLN	194	3.88

Таким образом, анализ электростатического потенциала бактериальной люциферазы и NADPH:FMN-оксидоредуктазы из *Vibrio harveyi* показал, что существуют структурные предпосылки только для образования слабого комплекса между этими ферментами. Несмотря на слабую структурную специфичность данных белков, возможно, важную роль в образовании комплекса играют гидрофобные взаимодействия, которые не учитываются использованным методом электростатики непрерывной среды.

Работа выполнена в рамках проекта «Биолюминесцентные биотехнологии» (договор № 11.G34.31.0058) в рамках Постановления Правительства РФ № 220 от 9 апреля 2010 г. «О мерах по привлечению ведущих ученых в российские образовательные учреждения высшего профессионального образования».

Список используемой литературы:

1. Jeffers, C.E. Differential Transfers of Reduced Flavin Cofactor and Product by Bacterial FlavinReductase to Luciferase/ C.E. Jeffers, Shiao-Chun Tu// *Biochemistry*. – 2001. - Vol. 40 - № 6 – 2001 – p. 1749-1754.
2. Tu, Shiao-Chun Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavinreductases/ Shiao-Chun Tu// *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2008 - № 7 – p. 183 – 188.
3. Low, J. C. Energy transfer evidence for in vitro and in vivo complexes of *Vibrio harveyi*flavinreductase P and luciferase/ J.C. Low, Shiao-Chun Tu// *Photochem. andPhotobiol.* – 2003. – Vol. 77 - № 4 – p. 446-452.
4. Campbell, Z.T. Fre is the major flavinreductase supporting bioluminescence from *Vibrio harveyi* luciferase in *Escherichia coli*/ Z.T. Campbell, T.O. Baldwin// *The Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol. 284 - № 13 –pp. 8322-8328.
5. Sali, A. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints./ A. Sali, T.L. Blundell// *J. Mol. Biol.* – 1993. –Vol.234 – pp. 779-815.
6. Bashford, D.Electrostatic Calculations of the pKa Values of Ionizable Groups in Bacteriorhodopsin/ D. Bashford, K. Gerwert//*J Mol Biol.* – 1992. - Vol. 224 - pp. 473-486.
7. Brooks,B. R.CHARMM: The Biomolecular simulation Program/ B. R. Brooks, C. L. Brooks III, A. D. Mackerell, L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch A. Caflisch, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoseck, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R. W. Pastor, C. B. Post, J. Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R. M. Venable, H. L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D. M. York, and M. Karplus // *J. Comp. Chem.* – 2009. - Vol. 30 –pp. 1545-1615.
8. Honig, B. Classical electrostatics in biology and chemistry/ B. Honig, A. Nicholls// *Science*. – 1995. – Vol. 268 – pp. 1144 – 1149.
9. Baker, N.A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome/ N.A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M.J. Holst, J.A. McCammon// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – Vol. 98 – pp. 10037-10041.
10. Ming Liu MCDOCK: a Monte Carlo simulation approach to the molecular docking problem/ Ming Liu, Shaomeng Wang// *Journal of Computer Aided Molecular Design*. – 1999. – Vol. 13 – pp. 435 – 451.