

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ М.И. Гладышев

«_____» _____ 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Экспериментальная регистрация комплекса бактериальной люциферазы
и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы

Руководитель _____ с.н.с., к.ф.-м.н. Е.В. Немцева
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник _____ ББ13-03Б _____ 041312198 _____ В.А. Кобец
номер группы номер зачетной книжки подпись, дата инициалы, фамилия

Красноярск 2017

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Экспериментальная регистрация комплекса бактериальной люциферазы и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы» содержит 49 страниц текстового документа, 12 иллюстраций, 4 таблицы, 41 использованный источник.

БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, БАКТЕРИАЛЬНАЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, АНИЗОТРОПИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ, ВРЕМЯ ВРАЩАТЕЛЬНОЙ КОРРЕЛЯЦИИ

Объект исследования – биферментная биолюминесцентная система бактерий.

Цель исследования: разработка методики экспериментальной регистрации комплекса между бактериальной люциферазой и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой, основываясь на имеющихся методах исследования взаимодействия между белками.

В ходе исследования проведен обзор имеющихся методов регистрации взаимодействия между белковыми молекулами. Были опробованы и модифицированы несколько методик определения непостоянных слабых белок-белковых комплексов, основанных на флуоресцентной спектроскопии. Построена математическая модель, описывающая сигнал анизотропии флуоресценции, получаемый при титровании одного белка раствором другого. С помощью модели описаны результаты экспериментального титрования NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы бактериальной люциферазой и получена константа диссоциации комплекса $0,2 \mu\text{M}$.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 Белок-белковые взаимодействия: виды и методы регистрации (обзор литературы).....	5
1.1 Типы белковых взаимодействий	5
1.2 Теоретические и экспериментальные методы изучения взаимодействия между белками	7
1.2.1 Теоретические (биоинформационные) подходы.....	7
1.2.2 Экспериментальные подходы.....	9
1.3 Взаимодействие между белками в биолюминесцентной системе бактерий	19
1.4 Исследования комплекса бактериальной люциферазы и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы другими авторами.....	23
2 Материалы и методы исследований	27
3 Результаты и обсуждение	Ошибка! Закладка не определена.
3.2.2 Построение математической модели взаимодействия белков..	Ошибка! Закладка не определена.
3.2.3 Экспериментальное титрование NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы люциферазой	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Регистрация взаимодействия между белками с помощью время-разрешенной анизотропии флуоресценции.....	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	29
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	31

ВВЕДЕНИЕ

Изучение взаимодействия между белками – широко представленная в современной биологии область. Знания о межбелковых контактах помогают понять фундаментальные основы биохимических реакций в клетке, что, в свою очередь, позволяет применять эти знания *in vitro* для управления активностью и стабильностью биохимических систем.

Образование комплекса между редуктазой и люциферазой бактерий уже исследовалось с помощью различных методов [1]. Предпосылкой для поиска комплекса между этими белками является, в частности, факт, что восстановленный флавиномононуклеотид (продукт оксидоредуктазы и субстрат люциферазы), не может существовать в клетке в свободном виде, так как подвергается быстрому автоокислению. С другой стороны, однозначного экспериментального доказательства присутствия комплекса в смеси этих двух ферментов так и не было получено [2, 3].

Среди экспериментальных методов, используемых для регистрации ассоциации белков, высокой чувствительностью и неинвазивностью обладают флуоресцентные методики, основанные, в частности, на явлении поляризации испускаемого молекулами света. При изучении белков часто используют флуоресцентные метки, обеспечивающие люминесценцию наблюдаемого объекта в видимом диапазоне.

Целью данной работы являлась разработка методики экспериментальной регистрации комплекса между бактериальной люциферазой и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой на основе анизотропии собственной флуоресценции этих белков.

1 Белок-белковые взаимодействия: виды и методы регистрации (обзор литературы)

Исследование белок-белковых взаимодействий обусловлено необходимостью более глубокого изучения функций белков, которые, как правило, работают в живых системах за счет взаимодействия друг с другом в составе стабильных или динамических белковых комплексов [4]. В представленном обзоре дается краткое описание и сравнительная оценка наиболее часто используемых методов.

1.1 Типы белковых взаимодействий

Биологические процессы в живых системах в большинстве своем происходят с участием огромного количества различных белков. При этом функционирование белковых молекул часто осуществляется за счет их взаимодействия друг с другом в составе стабильных или динамических белковых комплексов. Число и разнообразие белок-белковых взаимодействий у высших организмов настолько велико, что их графическое представление имеет вид крайне сложных и запутанных сетей [4].

Различают два типа таких комплексов: гомокомплексы и гетерокомплексы (рисунок 1). Гомокомплексы обычно являются постоянными и стабильными. Гетерокомплексы могут также обладать стабильностью, но могут и создаваться и разрушаться в зависимости от внешней среды или внешних факторов. Гетерокомплексы могут включать белки, которые также должны существовать независимо (в таких случаях говорят о слабых и непостоянных взаимодействиях). Распознавать различные типы комплексов важно при анализе межмолекулярных интерфейсов.

Разные типы комплексов выполняют разные биологические роли. Большинство гомодимеров наблюдаются только в многомерном состоянии, и их часто невозможно разделить без денатурации отдельных мономерных

структур. Многие комплексы фермент-ингибитор также сильно связаны, но эти молекулы могут существовать и независимо как стабильные молекулы в растворе. С эволюционной точки зрения, гомодимеры и гетерокомплексы эволюционировали таким образом, чтобы оптимизировать взаимодействие в соответствии с их биологической функцией. В некоторых примерах для обеспечения той или иной функции может потребоваться сильное связывание, тогда как в других обстоятельствах подойдет и более слабое взаимодействие. Напротив, взаимодействия антитело-белок являются относительно «случайными событиями» и выбираются главным образом по силе константы связывания, не подвергаясь эволюционной оптимизации в течение многих лет. Кроме того, некоторые белки могут образовывать комплексы только в специфическом состоянии, которое определяется наличием прикрепленных лигандов или зарядом кофакторов, то есть комплекс существует не всегда, и в определенных условиях белки могут совсем не проявлять сродства друг к другу. Таким образом, различают сильные, слабые и непостоянные взаимодействия, методики выявления которых могут сильно различаться [5].

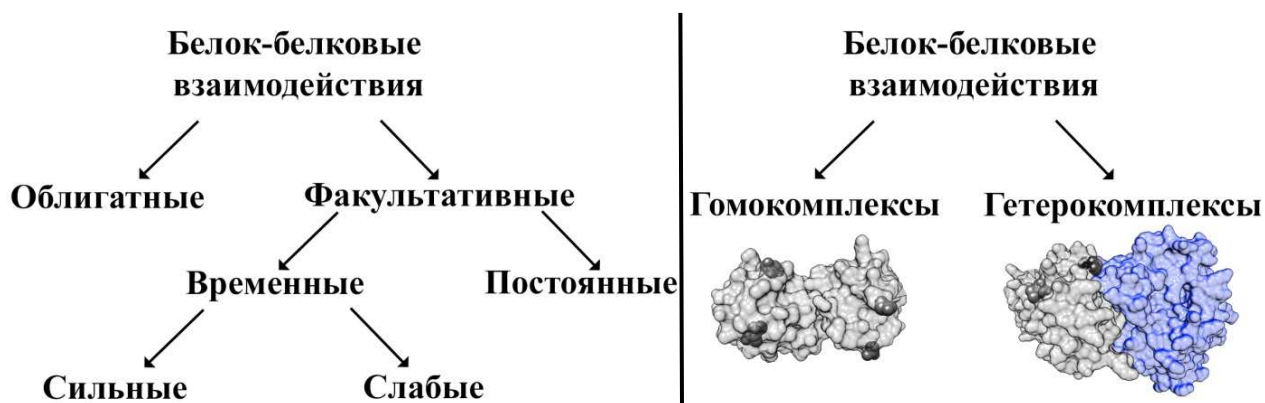


Рисунок 1 – Схема различных типов белок-белковых взаимодействий [6]

1.2 Теоретические и экспериментальные методы изучения взаимодействия между белками

Существует большое разнообразие методологических подходов, применяемых для изучения белковых взаимодействий. Это обусловлено тем, что белковая интерактомика находится на стыке различных научных дисциплин, таких, как биохимия, генетика, биоинформатика, компьютерное молекулярное моделирование, клеточная биология, молекулярная биология, биофизика и др. Условно все подходы можно разделить на две группы: биоинформационные и экспериментальные [4].

1.2.1 Теоретические (биоинформационные) подходы

Данная группа объединяет многочисленные вычислительные методы, которые ставят своей целью анализ имеющихся геномных, протеомных и интерактомных экспериментальных данных о белковых взаимодействиях и предсказание новых взаимодействий на основе выявляемых закономерностей. Различают 4 вида подходов, используемых для решения данных задач.

Подходы, основанные на геномной информации

Методы, базирующиеся на результатах полного геномного секвенирования, используют для предсказания комплекса информацию о всех имеющихся генах и их организации в геноме.

Анализ консерватизма расположения генов в геноме иногда позволяет судить о связанности транслируемых с этих генов белков. Работающим в комплексе белкам удобно располагаться в геноме рядом, так как для успешного взаимодействия связывающихся белков необходим схожий уровень экспрессии. Такие гены могут даже транскрибироваться в виде одной пре-мРНК с одного промотора. Иногда, в ходе эволюции, соседствующие функционально взаимосвязанные гены сливаются друг с другом. Продуктом трансляции такого гена является мультидоменный белок. В результате в одних организмах

существуют отдельные функционально связанные белки, а в других – единый белок слияния. Слияние белковых доменов указывает на то, что белки, соответствующие отдельным доменам, вероятнее всего образуют комплекс друг с другом. Был разработан ряд вычислительных методов поиска таких слитных белков параллельно во многих геномах, и с их помощью были предсказаны тысячи белковых взаимодействий [7]. Многие из этих предполагаемых взаимодействий были подтверждены экспериментально [4].

Подходы, основанные на эволюционных взаимосвязях белков

Эта группа методов использует для предсказания комплексов или функциональной взаимосвязи белков филогенетические профили.

Филогенетический профиль белка указывает на наличие гомологов этого белка в других организмах. Белки, имеющие сходные профили, могут быть функционально связаны. Например, белки, входящие в один и тот же мультимерный белковый комплекс, или белки из одного биохимического пути имеют сходные филогенетические профили [4]. С помощью сравнительного геномного филогенетического анализа были предсказаны сотни пар белковых взаимодействий в *E. coli* и тысячи в дрожжах [8].

Подходы, основанные на трехмерной структуре белка

Данная группа методов последнее время приобретают все большее значение из-за быстрого роста числа исследованных пространственных структур белков.

Метод оценивает возможность формирования молекулярного комплекса с известной пространственной структурой при участии двух потенциально взаимодействующих белков и предсказывает, как взаимодействие может произойти. Было показано, что аминокислотные остатки в зоне контакта белков (контактный интерфейс) являются структурно консервативными, это позволяет оценивать возможное взаимодействие даже белков с неизвестными трехмерными структурами, но имеющих исследованный гомологов [9].

Подходы, основанные на первичной структуре белков

Эти подходы базируются на гипотезе, что комплексы могут быть выявлены путем нахождения нескольких коротких специфических полипептидных последовательностей (сигнатурные последовательности) [4]. Эти последовательности не соответствуют целым белковым доменам, но часто обнаруживаются в клеточных белках, где участвуют в образовании межбелковых связей [10].

1.2.2 Экспериментальные подходы

Данная группа подходов включает в себя геномные и биохимические технологии. Быстрый рост объема фактических данных в области белковой интерактомики последние годы способствовал широкому применению данной группы методов. Различают три основных группы методов для изучения белковых взаимодействий геномными подходами.

Дрожжевая двугибридная система

Основным подходом в этой группе является система двойных гибридов дрожжей, которая была первоначально разработана как генетический тест для детекции белковых взаимодействий в клеточной регуляции.

Данный подход базируется на установленном факте, что многие факторы транскрипции эукариот могут быть разделены на два функционально различных домена, один из которых контролирует связывание ДНК, а другой – активацию транскрипции. Клетки дрожжей трансфецируются двумя плазмидами: «наживкой» — целевым белком с прицепленным ДНК-связывающим доменом дрожжевого фактора транскрипции, и «добычей» — библиотеки кДНК фрагментов, прицепленным к активирующему домену транскрипционного фактора. Транскрипция репортерных генов не начнется, пока наживка и добыча не провзаимодействуют, чтобы сформировать функционирующий транскрипционный фактор. Таким образом, по

присутствию результатов продукции репортерного гена можно судить о наличии взаимодействия между белками [4, 11].

Синтетические генетические матрицы (Synthetic Genetic Array, SGA)

В основу данного подхода легло наблюдение, что в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* среди примерно 6200 генов более 80% не являются жизненно важными, что говорит о высокой степени буферизации геномных пертурбаций. Был разработан метод анализа функциональной взаимосвязи белков путем проверки жизнеспособности штаммов с одновременным сочетанием двух мутаций [12]. Типичный анализ SGA состоит из матрицы пересечений мутации целевого белка с приблизительно 5000 жизнеспособных мутантных штаммов с одиночными делециями генов с целью выявления двойных мутантов с дефектом роста. Нарушение роста конкретного двойного мутанта свидетельствует о функциональной взаимосвязи генов (белков). В плане анализа комплексов с помощью данной технологии, предполагается, что полученные позитивные результаты анализа функциональной взаимосвязи генов (белков) частично обусловлены нарушением прямых взаимодействий [4].

Корреляционный профиль экспрессии мРНК

Эта группа методов основана на анализе корреляций транскриптомных и интерактомных данных. Была разработана стратегия картирования корреляций транскриптома и интерактома путем сравнения взаимодействий между белками, которые кодируются генами из общих кластеров профилей экспрессии, и белками, которые кодируются генами из разных кластеров. На примере *S. cerevisiae* было показано, что гены со сходными профилями экспрессии чаще кодируют взаимодействующие белки [13]. Таким образом, анализ корреляции транскриптомных и интерактомных данных может быть использован для улучшения качества гипотез, основанных на информации от обоих подходов [4].

Биохимические методы исследования белковых комплексов базируются на одном общем принципе, который очень схож с принципом рыбной ловли, что нашло свое отражение в используемой терминологии: белок-«наживка»

(bait protein), белок-«добыча» (prey protein), молекулярная «рыбалка» (molecular fishing). Белком-наживкой называют известный белок, который экспериментатор использует для «вылавливания» и идентификации одного или нескольких неизвестных белков-партнеров. Соответственно последние называются белками-«добычей». Можно выделить 6 основных групп методов такого типа.

Аффинная хроматография

Этот метод основан на специфичном связывании белков. Он очень удобен при первичном изучении белка, если надо зафиксировать образование комплекса между одним определенным белком и целым рядом других, например, всем содержимым клетки. К матриксу хроматографической колонки ковалентно или сайтспецифично цепляется белок, и через нее прогоняется концентрированный раствор других белков (например, все белки клетки). В результате, большинство белков вымываются из колонки даже небольшой концентрацией соли, остальные, связавшиеся с антителом, вымываются высокой концентрацией растворителя и уже в дальнейшем анализируются. Этот метод достаточно чувствителен, позволяет выявлять даже слабые взаимодействия [14].

Коиммунопреципитация

В этом подходе применяются специфические антитела для выделения из клеточного лизата целевых белков в комплексе с белками-партнерами. Далее используются различные методы разделения и анализа белков-партнеров. Выбор антител является ключевым звеном в данной технологии. Антитела к целевым белкам должны быть высокоаффинными (для достаточно прочного связывания антигена и его выделения из смеси) и высокоспецифичными (для минимизации не специфических взаимодействий). К сожалению, далеко не всегда для целевых белков существуют антитела, и это заставляет исследователей все-таки идти на модификацию целевых белков методами генной инженерии. Чаще всего это делается путем слияния целевого белка с

какой-либо специфической меткой в виде пептидного эпитопа, на который имеются селективные антитела [15].

Поверхностно-плазмонный резонанс

На подложку из металла с помощью различных лигандов крепится целевой белок. Сверху подложка заливается раствором с белком, с которым хотят проверить образование комплекса. Следует отметить, что из всех описанных ранее методов, этот единственный не является предварительным. Целью данного метода чаще всего является регистрация комплекса с определенным заранее одним белком, а не проверка пула белков. С обратной стороны металлическая пластина накрыта призмой, сквозь которую под определенным углом пропускают луч лазера. Отраженный от пластины и преломленный призмой луч регистрируют светоприемником. Если белки из раствора и белки на подложке образуют комплекс, изменяется резонансный угол регистрируемого света, что обусловлено явлением плазмонного резонанса [14].

Масс-спектрометрическая идентификация белков

Ключевым этапом протеомного анализа является идентификация белковых последовательностей при помощи комбинации высокопроизводительных методов разделения белков и их масс-спектрометрического анализа. Двумерный электрофорез (two-dimensional electrophoresis, 2DE) представляет собой метод разделения, основанный на последовательном использовании двух свойств белков: заряда и массы. Показано, что в одном эксперименте методом двумерного гель-электрофореза можно разделить более 2000 белков и их изоформ, а теоретическая разрешающая способность двумерного электрофореза может достигать 10 000 белков. Для визуализации белковых молекул можно использовать различные методы их окрашивания. Наиболее часто используются методы серебрения, окраски Кумасси голубым и рядом флуоресцентных красителей. Наиболее чувствительные методики позволяют зарегистрировать белки в концентрации до 10^{-9} М. Для осуществления идентификации представленные на

электрофореграмме в виде пятен белки вырезают, и затем проводят ферментативное расщепление белка в пятне. Полученный гидролизат анализируют при помощи масс-спектрометрии [4, 15].

Кросс-связывание

Суть данного метода заключается в следующем. Целевой белок смешивают с раствором других белков, с которыми он подозревается в специфичном связывании. К раствору добавляют специальный сшивающий агент, которых к настоящему моменту синтезировано уже очень много и которые отличаются как по радикальной группе, с которой они реагируют, так и по условиям, в которых их можно применять. Сшивающий агент реагирует одним своим концом с радикальной группой на поверхности целевого белка и вторым с теми белками, которые подходят на расстояние зоны досягаемости агента. Наибольшее количество сшиваний целевого белка приходится на тех, что образуют с ним комплекс. Дальнейший электрофорез в двух измерениях позволяет выделить и оценить молекулярную массу связанного белка [14].

Флуоресцентные методы (внутренние и внешние метки)

Главным преимуществом этого метода является неинвазивность – с белками не требуется проводить каких-либо процедур, присоединять к ним лиганды или промывать растворителем. Следовательно, этот метод гарантирует, что белки при измерении находятся в нативном состоянии и наличие комплекса или его отсутствие обусловлены только природой белков.

Среди многочисленных характеристических параметров флуоресценции (положение и форма спектра, квантовый выход, время жизни и др.), наиболее эффективным для оценки взаимодействия между белками является поляризация или анизотропия флуоресценции. Значение данного параметра связано с размером излучающей молекулы, а поэтому обладает высокой чувствительностью к образованию белок-белковых комплексов [16].

Принцип измерения анизотропии флуоресценции иллюстрирует рисунок 2. Образец возбуждают вертикально поляризованным светом. Затем измеряют интенсивность испускания через поляризатор. Когда регистрирующий

поляризатор ориентирован параллельно направлению поляризованного возбуждения (\parallel), происходит регистрация интенсивности I_{\parallel} . И наоборот, когда поляризатор перпендикулярен к возбуждению (\perp), интенсивность называется I_{\perp} . Анизотропия r определяется по формуле (1).

$$r = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + 2GI_{\perp}}, \quad (1)$$

где G – отношение чувствительностей детектирующей системы для вертикально и горизонтально поляризованного света.

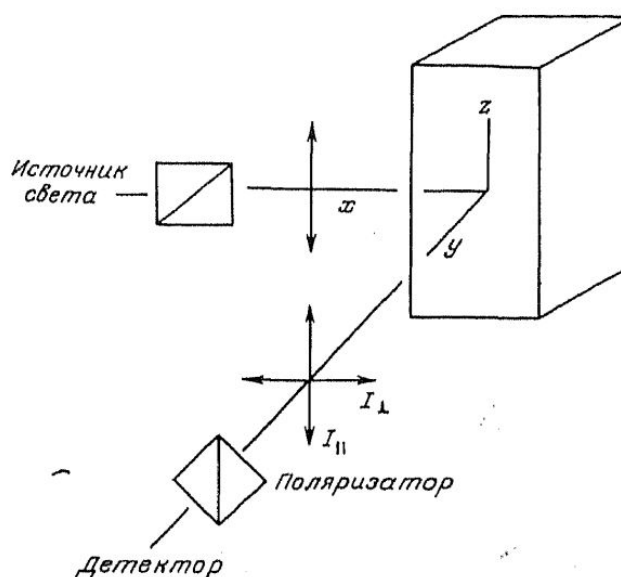


Рисунок 2 – Схема измерения анизотропии флуоресценции [17]

При возбуждении раствора флуорофоров поляризованным светом в результате эффекта фотоотбора излучаемая флуоресценция также поляризована, но уже частично из-за того, что за время жизни флуоресценции происходит вращательная диффузия возбужденной молекулы. Чем меньше размер молекулы, тем быстрее она вращается.

Таким образом, значение анизотропии флуоресценции отражает степень деполяризации переизлученного света. Измерения анизотропии выявляют среднее угловое смещение флуорофора, которое происходит между поглощением и последующим испусканием фотона. Оно зависит от скорости и

степени вращательной диффузии за время жизни возбужденного состояния по формуле (2,3). Диффузионные движения, в свою очередь, зависят от вязкости растворителя, размеров и формы диффундирующих частиц. По этой причине с помощью анизотропии флуоресценции можно детектировать образование комплексов между молекулами.

$$r = r_0 / [1 + (\tau/\theta)] , \quad (2)$$

$$r(t) = r_0 e^{-t/\theta} , \quad (3)$$

где τ – время жизни возбужденного состояния;

θ – время вращательной корреляции флуорофора, которое зависит от вязкости η , температуры T раствора и объема вращающейся области V по формуле (4).

$$\theta = \eta V / RT \quad (4)$$

Существует несколько режимов съемки анизотропии флуоресценции. В данной работе были использованы два из них: так называемые стационарная (Steady-State) и время-разрешенная (Time-Resolved) анизотропии. В первом случае объект возбуждают постоянным светом и считывают значения интенсивности флуоресценции при разных положениях поляризаторов. Во втором случае измеряют не только значения интенсивностей, но и скорость их затухания при импульсном возбуждении молекул. Для этого образец освещается импульсным светом, и за один раз снимается целый пул значений интенсивностей с шагом в несколько пикосекунд. Первый вариант удобнее, если необходимо получить стационарные значения анизотропии и по ним судить об изменениях в системе, например, при титровании одного вещества

другим. Время-разрешенная анизотропия же более показательная и позволяет рассчитывать дополнительные значения: время вращательной корреляции по формуле (3), время жизни возбужденного состояния, объем и молекулярную массу молекул по формуле (4) [16].

Нетривиальным вопросом при подготовке регистрации комплекса методом анизотропии флуоресценции является выбор флуорофора, параметры которого и будут записываться в ходе эксперимента.

Чаще всего, при регистрации белок-белковых взаимодействий один из белков метят флуоресцентной молекулой со специфичными спектрально-люминесцентными характеристиками. Широкий диапазон длин возбуждения различных флуорофоров, представленных в продаже, позволяет отделить сигнал комплекса от остальных фоновых сигналов аутофлуоресценции образца. Примером такого флуорофора является FITC (флуоресцеин изотиоцианат), представляющий собой исходную молекулу флуоресцеина, функционализированную реакционноспособной изотиоцианатной группой ($-N = C = S$) на месте атома водорода на нижнем кольце структуры. Структура FITC представлена на рисунке 3. Это производное является реакционноспособным по отношению к нуклеофилам, включая аминные и сульфгидрильные группы на белках. FITC характеризуется максимальной длиной волны возбуждения и излучения около на 495 нм и 519 нм соответственно. Метод FITC очень эффективен и точен, но имеет несколько недостатков. Один из белков в реакции приходится метить сторонней молекулой, а это может повлечь изменение нативной структуры и свойств белка и, таким образом, повлиять на его способность к комплексообразованию.

Выходом из данной ситуации может стать измерение собственной флуоресценции молекул, входящих в состав комплекса. В этом случае никакие сторонние реактивы не применяются и молекулы никак не модифицируются. Источником флуоресцентного сигнала могут быть сами белки. Белки могут флуоресцировать за счет ароматических аминокислот, входящих в их состав, главным образом триптофана. Сложностью такого подхода является то, что

светятся оба белка комплекса, это накладывает определенные трудности на обработку результатов и расчет параметров возможного комплекса. Внутренним флуорофором могут стать различные кофакторные флуоресцирующие молекулы, например, окисленный флавиномононуклеотид (FMN). В процессе биолюминесцентной реакции бактерий происходит передача восстановленного FMN от NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы к люциферазе посредством комплекса либо через среду. Таким образом, по временам вращательной корреляции FMN можно определить параметры комплекса, если он образуется. Недостаток этого подхода в том, что свободного FMN может быть на порядок больше, чем связанного с белком, и аппаратура должна обладать высокой чувствительностью, чтобы зарегистрировать полезный сигнал от связанного FMN.

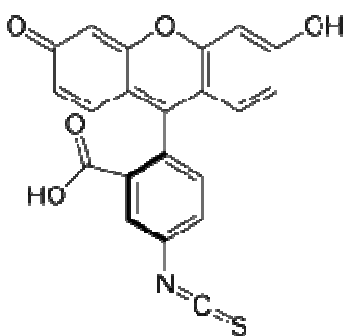


Рисунок 3 - Структура флуоресцеин изотиоцианата

Подводя итог обзора методов регистрации белок-белковых комплексов, можно составить суммирующую таблицу с преимуществами и недостатками каждого из подходов (таблица 1). В данной работе были использованы флуоресцентные методы, так как они позволяют регистрировать слабые взаимодействия и обладают большим преимуществом в виде возможности исключения каких-либо модификаций с белковыми молекулами.

Таблица 1 – Обзор методик регистрации белок-белковых комплексов [4]

Название метода	Преимущества	Недостатки
Биоинформационные методы	Не требуют модификаций с белками, легко воспроизводимы	Являются методами прогнозирования, требуют дополнительного экспериментального подтверждения, не очень точны из-за неполноты данных о геномах всех организмов, плохо работают со слабыми комплексами
Геномные методы	Достаточно точные	Требуют модификаций белков или генома, очень сложны в экспериментальной части
Биохимические методы	Точны, позволяют работать с целым пулом различных молекул, чувствительны к низким концентрациям	Требуют модификаций белков, плохо работают со слабыми и нестабильными комплексами
Анизотропия собственной флуоресценции молекул	Не требуют модификаций белков, просты в экспериментальной части	Сложны в обработке результатов, не очень точны из-за требований к неизвестным параметрам комплекса

1.3 Взаимодействие между белками в биолюминесцентной системе бактерий

Люминесцентные бактерии являются наиболее широко распространенными светоизлучающими организмами, обитающими преимущественно в морской воде, реже – в наземной и пресноводной среде. Хотя большинство люминесцентных бактерий свободноживущие виды, некоторые из них являются симбионтами организмов.

Существует четыре основных рода светящихся бактерий: *Photobacterium*, *Vibrio*, *Aliivibrio* и *Photorhabdus*. Виды, существующие в морской среде, в основном подразделяются на роды *Photobacterium* и *Vibrio*, первые, как правило, являются симбионтами светящихся органов морских животных, тогда как вторые существуют как свободноживущие формы. Однако все светящиеся бактерии представляют собой палочковидные, грамотрицательные микроорганизмы со жгутиками [18].

Биолюминесцентная система бактерий состоит из бактериальной люциферазы, катализирующей излучение света, и ферментов, обеспечивающих и регенерирующих ее субстраты. Схема реакций бактериальной биолюминесцентной системы представлена на рисунке 4.

Бактериальная люцифераза представляет собой гетеродимер, состоящий из двух субъединиц (α и β) с молекулярной массой около 40 kDa и 37 kDa, соответственно. Активный центр находится внутри α -субъединицы. В отсутствие β -субъединицы α -субъединица работает неэффективно с низким световым выходом. Поскольку кристаллическая структура люциферазы *V. harveyi* обнаруживает обширные взаимодействия и сложные схемы связывания между несколькими боковыми группами и основной цепью α - и β -субъединиц, предполагается, что функцией β -субъединицы является содействие в конформационном изменении молекулы во время катализа.

Субстратами бактериальной люциферазы являются восстановленный флавиномононуклеотид (FMNH₂), молекулярный кислород и длинноцепочечный альдегид (RCHO) (5). Энергия, выделяющаяся во время окисления FMNH₂ и альдегида до FMN и карбоновой кислоты (RCOOH) тратится на излучение сине-зеленого света (с максимумом при длине волны ~ 490 нм) [18].

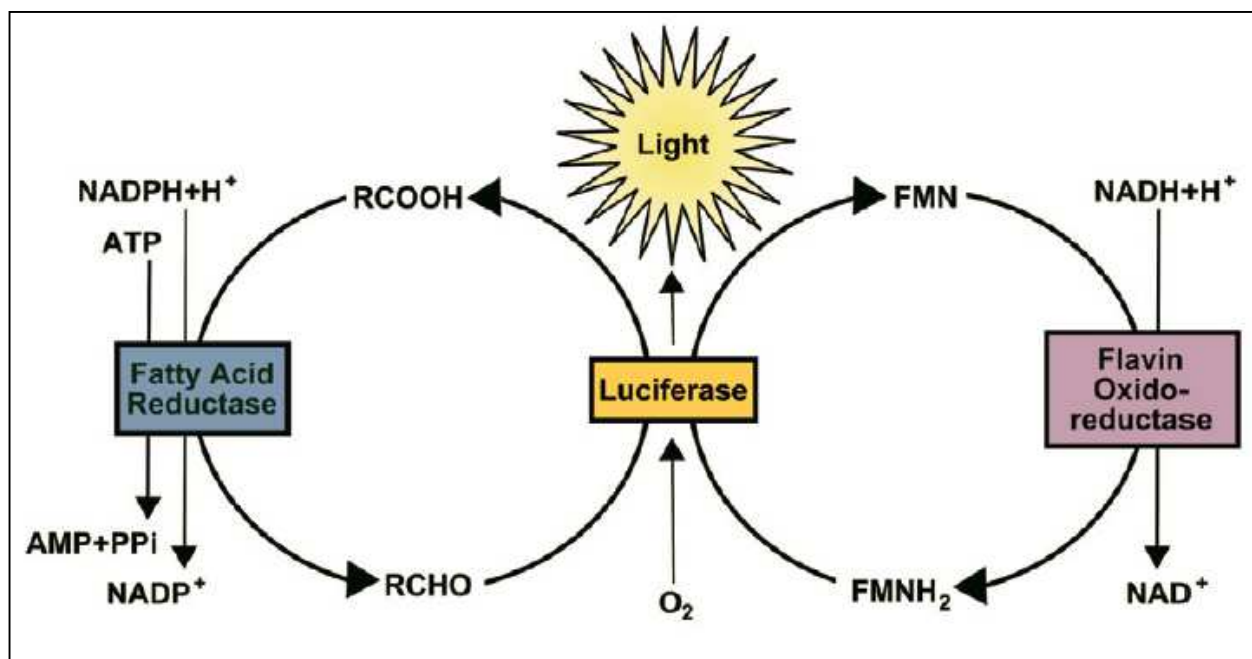
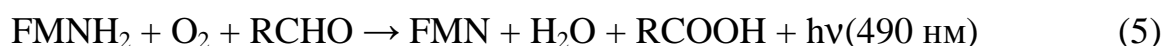


Рисунок 4 - Схема биOLUMиНесцентной реакции [20]



Помимо бактериальной люциферазы, некоторые светящиеся бактерии несут флуоресцентные белки, которые изменяют цвет свечения. Взаимодействие голубого флуоресцентного белка (т.н. люмазинового белка) в *P. leiognathi* с люциферазой ведет к излучению фотонов более высокой энергии (максимум ~ 478 нм), соответствующей голубому цвету. Аналогично, наличие желтого флуоресцентного белка *A. fischeri* приводит к излучению желтого света (максимум ~ 545 нм) [18].

Для обеспечения стабильности световой эмиссии во времени необходимым является непрерывное возобновление субстратов для реакции биOLUMиНесценции, без чего последняя прогрессивно затухает. В связи с этим

в бактериальных клетках имеются две основные вспомогательные ферментные системы, первая из которых снабжает люциферазу восстановленными формами флаavinмоноклеотида, а вторая ответственна за регенерацию альдегидов из соответствующих жирных кислот

За первый из этих процессов ответственны NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы, *in vivo* формирующие с люциферазой единую электрон-транспортную цепь и обеспечивающие последнюю восстановленным флаavinмоноклеотидом (FMNH₂), в свою очередь возникающим в процессе восстановления FMN за счет энергии NAD(P)H. В зависимости от фосфорилированности NAD(P)H, который утилизируется оксидоредуктазой, различают несколько видов бактериальных оксидоредуктаз: FRP (окисляет только NADPH), FRG (окисляет и NADPH, и NADH) и FRD (окисляет только NADH).

NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза *V.harveyi* представляет собой гомодимер из двух идентичных субъединиц, связывающих FMN и NAD(P)H в пространстве между обращенными друг к другу поверхностями. При этом каждая из подобных субъединиц имеет молекулярный вес 26,3 kDa и состоит из двух доменов, первый из которых складывается из четырех антипараллельных бета-слоев, с каждой стороны фланкированных альфа-спиралями. Второй домен протягивается от одной субъединицы к другой и предположительно ответственен за сцепление между ними. В двух симметричных участках между субъединицами фермента расположены две молекулы FMN, каждая из которых сильно связана с белком сетью из 16 водородных связей. В свою очередь за специфическое связывание NAD(P)H, выступающего в качестве доноров водорода для восстановления FMN, отвечают гибкие аминокислотные петли. В результате молекулы NAD(P)H (донора) и FMN (акцептора) в подобной структуре оказываются расположенными параллельно друг другу на расстоянии 3,6 Å, что является условием для переноса протонов водорода между ними [19].

На основании особенностей кинетики, катализируемой данными ферментами реакции, а также высокой степени их сродства не только к FMN, но и к его восстановленной форме FMNH₂, было выдвинуто предположение, что последний передается к люциферазе не в растворенной форме через цитозоль, а посредством формирования специфического промежуточного комплекса «FMN-редуктаза-люцифераза».

Проблема образования комплекса между редуктазой и люциферазой бактерий активно изучалась последние годы, потому что некоторые косвенные данные явственно говорят о том, что комплекс должен быть. Исследования показали, что FMNH₂ не может существовать в клетке в свободном виде, так как подвергается быстрому автоокислению, образуя перекись водорода и свободные радикалы. Суммарное уравнение этого процесса представлено ниже (6).



Быстрое автоокисление FMNH₂ требует дополнительных резервов клетки NAD(P)H для его восстановления. Свободные радикалы и излишняя трата NAD(P)H не очень эффективны с точки зрения клеточного метаболизма. Следовательно, напрашивается вывод о необходимости образования комплекса [21, 22].

Вторым важнейшим субстратом, постоянное поступление которого необходимо для бесперебойного функционирования люциферазы, является длинноцепочечный алифатический альдегид. При этом биосинтез альдегидов в люминесцирующих бактериях в значительной степени идет по пути восстановления жирных кислот, являющихся одним из продуктов люминесцентной реакции, которые после подобного превращения вновь вступают в нее. Значимость подобного пути определяется не только «экономическими» соображениями, но и тем, что длинноцепочечные жирные кислоты являются конкурентными ингибиторами реакции биoluminesценции и поэтому должны динамически удаляться из цитозоля [19].

За данный процесс в бактериальных клетках отвечает мультиферментный комплекс восстановления жирных кислот. Структура данного мультиферментного комплекса впервые наиболее подробно изучена на примере *P. phosphoreum*, у которого он имеет молекулярную массу около 500 kDa. В его состав входят три белка: ацилтрансфераза с молекулярной массой 33 kD; лигаза длинноцепочечных жирных кислот с молекулярной массой 42 kDa, а также ацил-редуктаза с молекулярной массой 54 kDa. При этом каждый из этих белков присутствует в составе мультиферментного комплекса количестве четырех идентичных копий. Образованная тремя типами названных выше ферментных белков сложная архитектура складывается из центрального тетрамера, состоящего из четырех субъединиц редуктазы, каждая из которых взаимодействует со своей синтетазной субъединицей, а та, в свою очередь, слабо связана с субъединицей трансферазы. Многостадийный характер реакций, катализируемых компонентами мультиферментного комплекса редукции жирных кислот, объясняют его столь сложную пространственную организацию, целью которой является эффективное перемещение интермедиатов от одной субъединицы к другой. Другой причиной является гидрофобный характер промежуточных продуктов реакции, делающий невозможным их свободное перемещение через обводненный цитозоль [19].

1.4 Исследования комплекса бактериальной люциферазы и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы другими авторами

Образование комплекса между люциферазой и редуктазой из разных организмов было несколько раз исследовано различными методами [1]. Были получены противоречивые результаты, что может объясняться тем, что если комплекс и есть, то он слабый для того, чтобы его можно было достоверно зарегистрировать. Для исследования взаимодействия с редуктазой бактериальной люциферазы из *Vibrio harveyi* использовали два метода.

Во-первых, была осуществлена регистрация комплекса по технологии BRET (bioluminescence resonance energy transfer) [2]. Схема метода изображена на рисунке 5. Метод основан на резонансном переносе энергии от биолюминесцентного белка на флуоресцентный. Если длина волны испускаемого донором света совпадает с длиной волны поглощения акцептором, последний переходит в возбужденное состояние по резонансному механизму и переизлучает свет уже в более длинноволновой части спектра [23, 24]. В эксперименте NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза *Vibrio harveyi* (FRP) была сцеплена с флуоресцентной меткой (YFP), максимум излучения которой приходится на длину волны 530 нм, а поглощение совпадает с длиной волны испускания биолюминесцентной реакции *Vibrio harveyi* (максимум при 485 нм). При сближении в растворе молекул люциферазы и меченной оксидоредуктазы на расстояние от 1 до 10 нм происходит перенос энергии излучения с люциферазы на метку оксидоредуктазы. Измеряя интенсивность излучения на длине волны 530 нм (BRET-сигнал) можно оценить, какой процент энергии был перенесен на метку и, соответственно, какой процент люциферазы сблизился с редуказой на минимальное расстояние. Эксперимент проводили *in vivo* и *in vitro*. В результате был зарегистрирован сигнал BRET, но он оказался недостаточно сильным. Авторы работы объяснили это тем, что возможное место прикрепления флуоресцентной метки или ее ориентация не очень удачны, и в результате получается большая дистанция между YFP и люциферазой, даже когда белки сближаются при образовании комплекса.

Второй методикой, опробованной на бактериальной люциферазе, стала анизотропия флуоресценции [3]. В этом эксперименте FRP был помечен эозином с помощью свободных сульфгидрильных групп цистеиновых аминокислотных остатков. После титрования рабочего раствора люциферазой смотрели на изменение характеристик анизотропии флуоресценции. Если в результате титрования образуется комплекс между люциферазой и оксидоредуктазой, это влечет изменение гидродинамических характеристик молекулы эозина, что отражается на регистрируемой анизотропии. В результате

анизотропия флуоресценции эозина росла с увеличением концентрации люциферазы в растворе, что может говорить об образовании комплекса. Была оценена константа диссоциации возможного комплекса как $K_d = 11\mu\text{M}$. Примечательно, что взаимодействие наблюдалось только для FRP в мономерной форме (при концентрации $0,13\ \mu\text{M}$). В живой клетке FRP, как правило, димер.

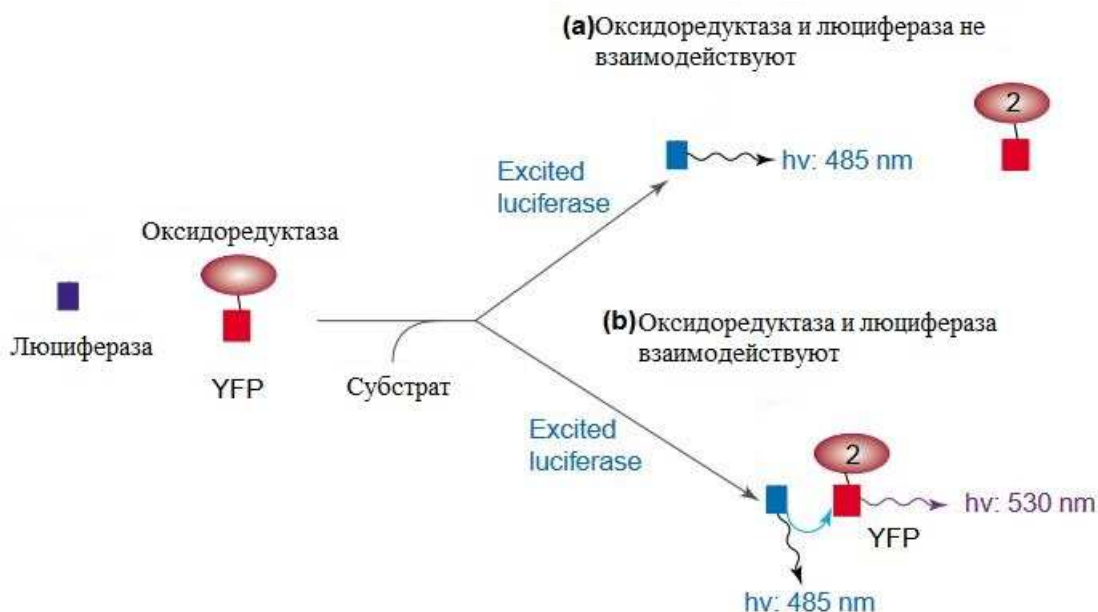


Рисунок 5 – Схема технологии BRET на примере люциферазы и редуктазы [24]

Так же возможность образования комплекса была оценена с помощью математического моделирования механизма сопряжения люциферазы и редуктазы [25]. Метод электростатики непрерывной среды позволяет провести анализ поверхностей ферментов (с учетом окружения). На основе электростатического потенциала белковых молекул определяют возможность образования комплекса. Это применимо только для тех белков, для которых определена кристаллическая структура. Результаты вычислительного моделирования взаимодействия NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы *Vibrio harveyi* (PDBID: 3FGC) и люциферазы из того же вида бактерий (PDBID: 2BKJ) показали, что если комплекс существует, то он слабый и не сильно обусловлен поверхностным потенциалом двух молекул [26].

Сложность исследования данной системы состоит в том, что если комплекс и существует, то он достаточно слабый и большинство методов, рассчитанных на сильные взаимодействия, в данном случае не подходят. Предварительные оценки константы связывания для данного комплекса $K_d = 7-11 \mu\text{M}$ [3].

Для достижения цели данного исследования были выбраны флуоресцентные методы регистрации комплекса, так как они требуют минимальных модификаций белка и позволяют улавливать слабые межмолекулярные взаимодействия.

2 Материалы и методы исследований

Реактивы

В работе были использованы следующие реактивы: бактериальная люцифераза *Photobacterium leiognathi* и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза *Alivibrio fischeri* (FRG или FRase I) производства лаборатории нанобиотехнологий и биолюминесценции Института биофизики СО РАН (Красноярск). Белки были изучены в калий-натриевом фосфатном буфере (0,05 М, рН 6,8).

Оборудование

Регистрацию спектров поглощения проводили на спектрофотометре Cary 5000 (Agilent Technologies).

Спектры и анизотропию флуоресценции определяли с помощью спектрофлуориметра Fluorolog 3 (Horiba Jobin Yvon). Время-разрешенную флуоресценцию и анизотропию флуоресценции регистрировали с помощью специализированной приставки спектрофлуориметра DeltaHub методом счета фотонов с временной корреляцией, используя возбуждение лазером DeltaDiode DD-405L с максимумом длины волны излучения 404 нм. Времена жизни выделяли с помощью метода деконволюции, для восстановления формы возбуждающего сигнала использовали высококоллоидное соединение Ludox

Зарегистрированные спектры испускания были откорректированы с учетом чувствительности прибора, эффекта внутреннего фильтра и фона от растворителя.

Методика эксперимента

Параметры связывания белков определяли методом флуоресцентного титрования. Процедуру флуоресцентного титрования проводили последовательным добавлением малой дозы (0,2-0,5 μ л) раствора люциферазы с концентрацией 125 μ М к 500 μ л раствора редуктазы с концентрацией 0,2 μ М. В процессе титрования регистрировали спектры поглощения и флуоресценции при длине волны возбуждения 295 нм, а также анизотропию флуоресценции при длине волны 340-370 нм. Титрование проводили в фосфатном буфере при

20 °С. Кривую титрования строили по анизотропии флуоресценции, усредненной по регистрации при 340-370 нм, для разных концентраций люциферазы.

Времена жизни возбужденного состояния измеряли для следующих растворов в фосфатном буфере: люциферазы (17 μM), NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы (35 μM) и их смеси в тех же концентрациях. Регистрацию проводили при длине волны 530 нм.

Вычислительное моделирование

Строили математическую модель изменения анизотропии флуоресценции раствора оксидоредуктазы при добавлении люциферазы в случае наличия и отсутствия комплекса между ними. Значения параметров модели (константу диссоциации) находили с помощью надстройки программного пакета MS Excel «Поиск решений».

Был осуществлен анализ распределения электростатического потенциала на поверхности белков путем решения уравнения Пуассона-Больцмана с помощью программного продукта APBS [27]. Кристаллические структуры редуказ *V.harveyi* и *A.fisheri* были взяты из базы данных RCSB Protein Data Bank [28, 29]. Сравнение аминокислотных последовательностей *люцифераз и редуказ из разных видов* было проведено с использованием программного продукта BLAST [30]. Аминокислотные последовательности белков были получены из базы данных National Center for Biotechnology Information [31, 32, 33, 34, 35]. Оценка доступной для растворителя площади поверхности (SASA) была осуществлена в программном продукте VMD [36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе представленного исследования взаимодействия между ферментами биOLUMИнесцентной системы бактерий – люциферазой и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой – были опробованы и модифицированы несколько флуоресцентных методик определения непостоянных слабых белок-белковых комплексов. В качестве источника сигнала люминесценции были выбраны внутренние флуорофоры исследованных белков – триптофановые остатки и эндогенный флавин. Главным преимуществом такого подхода является отсутствие необходимости изменения нативной структуры и конформации белка, что обеспечивает достоверность получаемых результатов.

Наиболее эффективной методикой оказалась регистрация стационарной анизотропии собственной (триптофановой) флуоресценции белков. Данная технология показала хороший сигнал даже при маленьких концентрациях белков и тем самым позволила провести титрование белков и определить константу диссоциации комплекса. Недостатком данной технологии является сложность обработки результатов и необходимость заранее знать некоторые параметры ожидаемого белок-белкового комплекса.

Регистрация время-разрешенной анизотропии флуоресценции эндогенного флавина также оказалась перспективной методикой. Главным ее преимуществом является прямое экспериментальное получение информации о размерах белковой молекулы или комплекса, к которому прикреплен флуорофор. Но оказалось, что низкое значение соотношения сигнал/шум при использовании в качестве флуорофора эндогенного флавина не позволяет с большой точностью определить параметры комплекса.

В результате выполненного исследования были сделаны следующие выводы:

1. Оксидоредуктазы бактерий *A. fischeri* и *P. leiognathi* имеют сходное распределение электростатического потенциала в области активного центра, поэтому могут взаимодействовать с бактериальной люциферазой по аналогичному механизму.

2. Метод анизотропии собственной флуоресценции белков при стационарном возбуждении свидетельствует об образовании комплекса между NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой и бактериальной люциферазой с константой диссоциации около 0,2 μ M.
3. Метод время-разрешенной анизотропии флуоресценции эндогенного флавина NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы показывает увеличение времени вращательной корреляции после добавления бактериальной люциферазы, что может быть подтверждением образования комплекса между белками.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Sucharitakul, J. Mechanisms of reduced flavin transfer in the two-component flavin-dependent monooxygenases / J. Sucharitakul, R. Tinikul, P. Chaiyen //Archives of biochemistry and biophysics. – 2014. – Т. 555. – С. 33-46.
2. Low, J. C. Energy transfer evidence for in vitro and in vivo complexes of *Vibrio harveyi* flavin reductase P and luciferase / J. C. Low, S. C. Tu //Photochemistry and photobiology. – 2003. – Т. 77. – №. 4. – С. 446-452.
3. Jeffers, C. E. Complex formation between *Vibrio harveyi* luciferase and monomeric NADPH: FMN oxidoreductase / C. E. Jeffers, J. C. Nichols, S. C. Tu //Biochemistry. – 2003. – Т. 42. – №. 2. – С. 529-534.
4. Иванов, А.С. Технологии белковой интерактомики / А.С. Иванов, В.Г. Згода, А.И. Арчаков // Биоорганическая химия. – 2011. – Т.37 - №.1. – С. 8-21.
5. Jones, S. Principles of protein-protein interactions / S. Jones, J.M. Thornton // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1999. – Т.93. - №.1. – С.13-20.
6. Acuner Ozbabacan, S. E. Transient protein–protein interactions / S. E Acuner Ozbabacan, H.B. Engin, A. Gursoy, O. Keskin //Protein engineering, design and selection. – 2011. – Т. 24. – №. 9. – С. 635-648.
7. Marcotte, E. M. Computational genetics: finding protein function by nonhomology methods / E.M. Marcotte //Current opinion in structural biology. – 2000. – Т. 10. – №. 3. – С. 359-365.
8. Pazos, F. Similarity of phylogenetic trees as indicator of protein–protein interaction / F. Pazos , A. Valencia //Protein engineering. – 2001. – Т. 14. – №. 9. – С. 609-614.
9. Aloy, P. Interrogating protein interaction networks through structural biology / P. Aloy, R.B. Russell //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – Т. 99. – №. 9. – С. 5896-5901.
10. Tan, S. H. A correlated motif approach for finding short linear motifs from protein interaction networks / S.H. Tan, W. Hugo, W.K. Sung, S.K. Ng //BMC bioinformatics. – 2006. – Т. 7. – №. 1. – С. 502.

11. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение, Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. - Москва: Мир, 2002. - 589 с., ил.
12. Yan Tong, A. H. Synthetic genetic array analysis in *Saccharomyces cerevisiae* / A.H. Yan Tong, C. Boone // *Yeast Protocol*. – 2006. – С. 171-191.
13. Ge, H. Correlation between transcriptome and interactome mapping data from *Saccharomyces cerevisiae*/ H. Ge, Z. Liu, G.M. Church, M. Vidal // *Nature genetics*. – 2001. – Т. 29. – №. 4. – С. 482-486.
14. Phizicky, E. M. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis / E. M. Phizicky, S. Fields // *Microbiological reviews*. – 1995. – Т. 59. – №.1. – С. 94-123.
15. Free, R. B. Identifying novel protein-protein interactions using co-immunoprecipitation and mass spectroscopy/ R.B. Free, L.A. Hazelwood, D.R. Sibley // *Current Protocols in Neuroscience*. – 2009. – Т.28. – №.5. – С. 1-14.
16. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии, пер. с англ. / Дж. Лакович. – Москва : Мир, 1986. – С. 496, с ил.
17. Немцева, Е.В. Поляризационные исследования флуоресценции биологических объектов / Е.В. Немцева, В.А. Кратасюк. - Красноярск, 2012. – С. 34, с ил.
18. Lin, L. Bacterial bioluminescence biochemistry and molecular biology [Электронный ресурс] / L. Lin, E. Meighen // *Photobiological Sciences Online* (KC Smith, ed.) American Society for Photobiology. – 2009. – Режим доступа: <http://photobiology.info/Lin.html>.
19. Дерябин, Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты / Д.Г. Дерябин. – Москва : Наука, 2009. – С. 248, с ил.
20. Miyashiro, T. Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri* / T. Miyashiro, E. G. Ruby // *Molecular microbiology*. – 2012. - №84(5). - С. 795-806.
21. Jeffers, C. E. Differential transfers of reduced flavin cofactor and product by bacterial flavin reductase to luciferase / C. E. Jeffers, S. C. Tu // *Biochemistry*. – 2001. – Т. 40. – №. 6. – С. 1749-1754.

22. Tu, S. C. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases / S. C. Tu //Photochemical & Photobiological Sciences. – 2008. – Т. 7. – №. 2. – С. 183-188.
23. Tu, S. C. Structural studies on bacterial luciferase using energy transfer and emission anisotropy / S. C. Tu, C. W. Wu, J. W. Hastings //Biochemistry. – 1978. – Т. 17. – №. 6. – С. 987-993.
24. Boute, N. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET / N. Boute, R. Jockers, T. Issad //Trends in pharmacological sciences. – 2002. – Т. 23. – №. 8. – С. 351-354.
25. Коваль, А.А. Молекулярное моделирование взаимодействия бактериальной люциферазы и NADPH:FMN-оксидоредуктазы [электронный ресурс] / А.А. Коваль // Молодежь и наука: сборник материалов IX всероссийской научно-технической конференции – Красноярск : Сиб. федер. ун-т., 2013. – Режим доступа: <http://conf.sfu-kras.ru/sites/mn2013/thesis/s093/s093-019.pdf>.
26. Koval, A. Docking of bacterial luciferase and NADPH: FMN-oxidoreductase using continuum electrostatic method / A. Koval, E. Nemtseva, M. Ullmann //The FEBS Journal. – 2013. – Т. 280. – №. 1. – С. 549
27. 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. – 1998. – С. 10037–10041.
28. Tanner, J. J. Flavine reductase P: structure of a dimeric enzyme that reduces flavin / J. J. Tanner //Biochemistry. – 1996. – Т. 35. – №. 42. – С. 13531-13539.
29. Koike, H. 1.8 Å crystal structure of the major NAD(P)H:FMN oxidoreductase of a bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri*: overall structure, cofactor and substrate-analog binding, and comparison with related flavoproteins / H. Koike //Journal of molecular biology. – 1998. – Т. 280. – №. 2. – С. 259-273.
30. Altschul, S. F. Basic local alignment search tool / S. F. Altschul //Journal of molecular biology. – 1990. – Т. 215. – №. 3. – С. 403-410.

31. Mandel, M. J. Comparative genomics-based investigation of resequencing targets in *Vibrio fischeri*: focus on point miscalls and artefactual expansions / M. J. Mandel, E. V. Stabb, E. G. Ruby //BMC genomics. – 2008. – T. 9. – №. 1. – C. 1.
32. Zenno, S. Identification of the gene encoding the major NAD (P) H-flavin oxidoreductase of the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* ATCC 7744 / S. Zenno //Journal of bacteriology. – 1994. – T. 176. – №. 12. – C. 3536-3543.
33. Fisher, A. J. Three-dimensional structure of bacterial luciferase from *Vibrio harveyi* at 2.4. Å resolution / A. J. Fisher //Biochemistry. – 1995. – T. 34. – №. 20. – C. 6581-6586.
34. Lei, B. *Vibrio harveyi* NADPH-flavin oxidoreductase: cloning, sequencing and overexpression of the gene and purification and characterization of the cloned enzyme / B. Lei //Journal of bacteriology. – 1994. – T. 176. – №. 12. – C. 3552-3558.
35. Ast, J. C Phylogenetic analysis of the lux operon distinguishes two evolutionarily distinct clades of *Photobacterium leiognathi* / J.C. Ast, P.V. Dunlap //Archives of microbiology. – 2004. – T. 181. – №. 5. – C. 352-361.
36. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics", J. Molec. Graphics, 1996, vol. 14, pp. 33-38.
37. Liu, M. *Vibrio harveyi* NADPH: FMN Oxidoreductase: Preparation and characterization of the apoenzyme and monomer–dimer equilibrium / M. Liu //Archives of biochemistry and biophysics. – 1997. – T. 337. – №. 1. – C. 89-95.
38. Tang, C. K. Flavin specificity and subunit interaction of *Vibrio fischeri* general NAD (P) H-flavin oxidoreductase FRG/FRase I / C. K. Tang //Archives of biochemistry and biophysics. – 2001. – T. 392. – №. 1. – C. 110-116.
39. Richmond, T. J. Solvent accessible surface area and excluded volume in proteins: Analytical equations for overlapping spheres and implications for the hydrophobic effect / T.J. Richmond //Journal of molecular biology. – 1984. – T. 178. – №. 1. – C. 63-89.
40. Vetrova, E.V. Characteristics of endogeneous flavin fluorescence of *Photobacterium leiognathi* luciferase and *Vibrio fischeri* NAD(P)H:FMN-

oxidoreductase / E.V. Vetrova, N.S. Kudryasheva, A.J.W.G. Visser, A. Van Hoek // Luminescence. – 2005. – T. 20. – №. 3. – C. 205-209.

41. Vetrova, E.V. Effect of quinone on the fluorescence decay dynamics of endogenous flavin bound to bacterial luciferase / E.V. Vetrova, N.S. Kudryasheva, K.H. Cheng // Biophysical chemistry. – 2009. – T. 141. – №. 1. – C. 59-65.