

Анализ различий кинетического механизма двух групп бактериальных люцифераз**Научный руководитель – Немцева Елена Владимировна***Кобзева В.С.¹, Лисица А.Е.²*

1 - Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Кафедра биофизики, Красноярск, Россия, *E-mail: VKobzeva11@yandex.ru*; 2 - Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Кафедра биофизики, Красноярск, Россия, *E-mail: ALisitsa@sfu-kras.ru*

Бактериальная люцифераза бактерий катализирует реакцию окисления длинноцепочечного альдегида и восстановленного флавина молекулярным кислородом, проходящую через формирование электронно-возбужденного интермедиата. В нестационарном режиме, при котором люцифераза совершает один оборот, интенсивность биолюминесценции *in vitro* достигает максимума за ~ 1 с, после чего экспоненциально затухает в течение 6 - 60 с, в зависимости от условий. Люциферазы из разных видов светящихся бактерий различаются по кинетике реакции: ферменты из родов *Photobacterium* и *Aliivibrio* относят к «быстрым» люциферазам, а из родов *Vibrio* и *Photorhabdus* - к «медленным», на основе показателя экспоненциального спада свечения [1]. Целью данной работы было определить различия в кинетических механизмах быстрых и медленных люцифераз.

В работе использовали препараты рекомбинантных люцифераз бактерий *P. leiognathi* и *V. harveyi*, полученных в Институте биофизики СО РАН (Красноярск). Кинетику биолюминесцентной реакции в нестационарном режиме регистрировали методом остановленного потока на анализаторе SX-20 (Applied Photophysics). Константы скоростей отдельных стадий реакции определили при помощи математической модели, разработанной в программном пакете SciLab в лаборатории теоретической биофизики Института биофизики СО РАН (Красноярск).

Были получены кинетические кривые биолюминесценции для реакций, катализируемых «быстрой» люциферазой *P. leiognathi* и «медленной» *V. harveyi* для широкого диапазона концентраций альдегидов с различной длиной цепи (октаналь, деканаль, додеканаль, тетрадеканаль), а также экспериментально определены скорости некоторых отдельных стадий реакции. Установлено, что (i) скорости связывания кислорода комплексом люциферазы с флавином не различаются для двух люцифераз, (ii) реакции двух люцифераз проходят с различными скоростями распада интермедиата С4а-гидропероксифлавина (4,6 и 15 с⁻¹ для *V. harveyi* и *P. leiognathi* соответственно), (iii) кинетика реакции люциферазы *P. leiognathi* с октаналем и додеканалем характеризуется всплеском свечения, предшествующим основному максимуму интенсивности, что ранее было зарегистрировано только для люциферазы *V. harveyi* [2] и считалось особенностью «медленных» люцифераз. Путем варьирования типа смешивания было показано, что наличие всплесков не объясняется независимым связыванием двух субстратов.

В ходе вычислительного моделирования кинетики было показано, что различия кинетических профилей реакций двух люцифераз с додеканалем в значительной степени обусловлено различиями каталитических констант.

Источники и литература

- 1) Deeva A. A. et al. Structural distinctions of fast and slow bacterial luciferases revealed by phylo-genetic analysis //Bioinformatics. – 2016. – Т. 32. – №. 20. – С. 3053-3057.

- 2) 2. Suadee C. et al. Luciferase from *Vibrio campbellii* is more thermostable and binds reduced FMN better than its homologues // *Journal of biochemistry*. – 2007. – Т. 142. – №. 4. – С. 539-552.