

Роль структурных особенностей бактериальных люцифераз в обеспечении их кинетических свойств

Научный руководитель – Кратасюк Валентина Александровна

Деева А.А.¹, Лисица А.Е.²

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

Биолюминесценция бактерий происходит в результате работы ряда сопряженных ферментативных реакций. Основным ферментом, обеспечивающим испускание света, является бактериальная люцифераза, катализирующая многостадийную реакцию с участием FMNН₂, алифатического альдегида и молекулярного кислорода. Ранее на основе кинетики этой реакции, люциферазы бактерий разных видов условно разделяли на «быстрые» и «медленные» [1]. Целью данного исследования было выявление структурных особенностей двух типов люцифераз, определяющих кинетические характеристики данных ферментов.

Основываясь на аннотации геномов 23-х видов светящихся бактерий, была отобрана 21 аминокислотная последовательность люциферазы. Для множественного выравнивания использовали программу MAFFT. С помощью программы ProtTest 3.4.2 выбирали модель аминокислотных замен (LG+G) для построения филогенетического дерева в программе PhyML-3.1. Поиск специфичных позиций проводили при помощи Diverge 3.0. Также проводили измерение нестационарной кинетики биолюминесцентной реакции двух типов люцифераз методом остановленного потока с использованием анализатора SX-20 (Applied Photophysics).

Филогенетический анализ показал, что бактериальные люциферазы образуют две клады, каждая из которых содержит белки только одного типа. Было выявлено 22 специфичные позиции выравнивания, консервативные только в рамках клады. При этом 9 из них предположительно отвечают за кинетические особенности. В частности, анализ пространственного положения найденных специфичных позиций α Met74, α Gly75, α Val106 «быстрых» и α Ala74, α Ala75, α Cys106 «медленных» люцифераз показал, что они могут обеспечивать различные способы стабилизации гидропероксифлавинового интермедиата в активном центре. Полученные данные согласуются с экспериментальными результатами, показавшими, что распад данного интермедиата происходит в 3 раза быстрее у «быстрой» люциферазы, чем у медленной.

Таким образом, в ходе эволюции бактериальной люциферазы сформировалось два различных типа структур, отвечающих за связывание и стабилизацию флавина в активном центре, что может отражаться на кинетических характеристиках данного фермента.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, Правительства Красноярского края и Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта № 20-44-243002.

Источники и литература

- 1) Valkova N., Szittner R., Meighen E. A. Control of luminescence decay and flavin binding by the LuxA carboxyl-terminal regions in chimeric bacterial luciferases //Biochemistry. 1999. Т. 38. № 42. С. 13820-13828.