На правах рукописи

Деева

Деева Анна Андреевна

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СТРУКТУРЫ ЛЮЦИФЕРАЗ И NAD(P)H:FMN-ОКСИДОРЕДУКТАЗ СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ: ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ И МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

03.01.02 — биофизика

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Красноярск — 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), г. Красноярск.

Научный руководитель:	**Кратасюк Валентина Александровна** доктор биологических наук, профессор
Официальные оппоненты:	**Щербаков Дмитрий Юрьевич** доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН), г. Иркутск, заведующий лабораторией геносистематики, главный научный сотрудник
	Кондратьев Максим Сергеевич кандидат физико-математических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН), г. Пущино, заведующий лабораторией структуры и динамики биомолекулярных систем
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН), г. Владивосток

Защита состоится «13» декабря 2018 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д003.075.04 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» по адресу: 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, д. 50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН и на сайте http://www.ibp.ru.

Автореферат разослан «__» ________ 2018 года.

Ученый секретарь диссертационного совета — Есимбекова Елена Николаевна

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы.

Идентификация функциональных сайтов в пространственной структуре белков имеет фундаментальное значение для понимания механизмов работы ферментов. В связи с этим установление эволюционно обусловленных структурных особенностей белковых молекул, обеспечивающих функционирование живых систем, является актуальной задачей. Биолюминесцентная система бактерий представляет собой удобный объект для изучения взаимосвязи между структурой и функцией ферментов, поскольку о работе бактериальной люциферазы и сопряженных с ней белков можно судить по испусканию видимого света. Она является одной из наиболее изученных биолюминесцентных систем, обнаруженных у светящихся организмов разной степени сложности, но многие аспекты её структурной и функциональной организации на данный момент не установлены окончательно.

Бактериальная люцифераза играет ключевую роль в процессе светоизлучения, она катализирует реакцию окисления органических субстратов с испусканием кванта света. Эффективная работа люциферазы в клетке обеспечивается сопряжением с другими ферментами, в частности, восстановление одного из субстратов люциферазы, FMN, осуществляет NAD(P)H-зависимая оксидоредуктаза. Данные белки широко используются при создании высокочувствительных систем индикации следовых количеств различных веществ и в фундаментальных исследованиях для изучения ферментативных каскадов и цепей сопряжения с ферментами липидного и энергетического обмена.

Люцифераза и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы разных типов были выделены из некоторых видов светящихся бактерий, включая *Aliivibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium leiognathi* и *Photorhabdus luminescence*, что позволило исследовать *in vitro* как характеристики каждого из белков, так и биферментных систем, сконструированных на их основе. Оказалось, что кинетические и физико-химические свойства, специфичность к субстрату и другие особенности люцифераз и оксидоредуктаз из разных видов светящихся бактерий могут значительно варьировать.

К настоящему времени описано более 25-ти видов светящихся бактерий, при этом интенсивное развитие методов молекулярной биологии и биоинформатики привело к расшифровке не только геномов большинства видов, но и позволило достаточно детально идентифицировать белок-кодирующие гены. Однако, несмотря на наличие обширного массива данных, включающего нуклеотидные последовательности генов и первичные последовательности белков, выделение и экспериментальное исследование свойств люцифераз и оксидоредуктаз из новых или малоизученных светящихся бактерий происходит медленно, поскольку представляет собой трудоемкую задачу. При этом, анализ первичных последовательностей и пространственных структур белков методами биоинформатики и молекулярного моделирования позволяет установить структурные особенности и предсказать расположение сайтов связывания субстратов и специфичных структурных мотивов, в том числе отвечающих за взаимодействие между белками, которые сформировались в результате различных эволюционных процессов. Знание структурно-функциональных особенностей может сузить поиск новых ферментов светящихся бактерий с определенными свойствами или стать основой для направленного мутагенеза используемых в настоящее время белков. Кроме того, выяснение вопроса, взаимодействуют ли люцифераза и оксидоредуктаза, является актуальным и позволяет увеличить чувствительность и улучшить другие характеристики биолюминесцентных методов.

Целью данной работы являлось установление эволюционно обусловленных структурных особенностей люцифераз и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз светящихся бактерий, обеспечивающих функционирование биолюминесцентной системы.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Филогенетический анализ первичных последовательностей бактериальной люциферазы, определение консервативных и вариабельных участков белка, выявление особенностей структуры активного центра и функциональных сайтов.
2. Поиск первичных последовательностей NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз светящихся бактерий, известных как источники восстановленного флавина для биолюминесцентной реакции, и анализ их коэволюции с люциферазой. Выявление функционально значимых структурных мотивов различных типов оксидоредуктаз.
3. Определение структурных предпосылок образования комплекса с прямым переносом восстановленного флавина между люциферазой и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой с учётом структурной вариабельности данных белков.

Научная новизна:

В результате филогенетического анализа 21 аминокислотной последовательности бактериальной люциферазы впервые описаны высоко консервативные участки данного белка и специфичные аминокислотные остатки, которые вносят основной вклад в классификацию люцифераз при разбиении на две группы — люциферазы с «быстрой» и «медленной» кинетикой.

Проанализирована функциональная роль 22 консервативных аминокислотных остатков, участвующих в разбиении люцифераз на группы. Впервые на основе известной структуры «медленной» люциферазы проведено моделирование активного центра «быстрого» фермента и показано существование двух различных способов взаимодействия флавинмононуклеотида с активным центром люциферазы за счет серосодержащих аминокислотных остатков.

Впервые проведен масштабный поиск и филогенетический анализ расшифрованных к настоящему времени аминокислотных последовательностей NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз светящихся бактерий — потенциальных участников биолюминесцентной реакции. Найдены консервативные домены для двух основных семейств белков — флавин-зависимых оксидоредуктаз и нитроредуктаз. Описаны изменения в структуре сайтов связывания FAD и NAD(P) флавин-зависимых оксидоредуктаз LuxG (закодированной в *lux*-опероне) и Fre (фермент «домашнего хозяйства»), произошедшие в результате эволюции после дупликации гена, кодирующего их общего предка.

С помощью метода молекулярного докинга впервые проведено моделирование взаимодействия за счет электростатических сил между бактериальной люциферазой и NADPH:FMN-оксидоредуктазой из *Vibrio harveyi* — пары ферментов, для которой образование комплекса было показано экспериментально.

Практическая значимость полученных результатов определяется необходимостью систематизации данных по структурным характеристикам люцифераз и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз светящихся бактерий для их использования в разработке аналитических методов, основанных на бактериальной биолюминесценции *in vitro*. Проведённая идентификация критических аминокислотных остатков, играющих важную роль в функционировании ферментов и их взаимодействии, позволяет реализовать сайт-направленный мутагенез для изменения свойств биферментной системы в составе биотестов. Полученные данные могут быть использованы для увеличения чувствительности и стабильности ферментов биолюминесцентной системы бактерий при конструирования реагентов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Все известные в настоящий момент бактериальные люциферазы по строению активного центра делятся на две высоко консервативные группы с альтернативным способом стабилизации интермедиатов биолюминесцентной реакции.

2. Оксидоредуктазы LuxG, закодированные в *lux*-опероне светящихся бактерий, в процессе эволюции утратили консервативность сайтов

связывания FAD, характерную для флавопротеинов FNR и гомологичных редуктаз Fre, что обусловлено необходимостью восстановления FMN для биолюминесцентной реакции.

3. Вариабельность позиций выравнивания, формирующих локальные сайты доступные растворителю на поверхности оксидоредуктаз LuxG вблизи активного центра, свидетельствует об отсутствии структурных предпосылок для образования комплекса с бактериальной люциферазой.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались на следующих научных форумах: Школа молодых ученых «Биоинформатика и системная биология» (Новосибирск, 30 июня – 2 июля 2012), IX Всероссийская научно–техническая конференция с международным участием «Молодежь и наука» (Красноярск, 15 апреля – 25 апреля 2013), 38-й Конгресс Федерации Европейских Биохимических обществ «Биологические механизмы» (Санкт-Петербург, 6–11 июля 2013), 9-я Международная конференция по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (Новосибирск, 23–28 июня 2014), 19-я Международная пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 20–24 апреля 2015), 19-й Международный симпозиум по биолюминесценции и хемилюминесценции (Япония, Цукуба, 29 мая – 2 июня 2016), 10-я Международная конференция по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (Новосибирск, 23 июня – 28 июня 2016), 24-я Международная конференция «Математика. Компьютер. Образование» (Пущино, 23–28 января 2017), 9-я Школа молодых ученых «Системная биология и биоинформатика» (Крым, Ялта, 25–30 июня 2017), 20-й Международный симпозиум по биолюминесценции и хемилюминесценции (Франция, Нант, 28–31 мая 2018).

Основные результаты диссертации докладывались на научных семинарах кафедры биофизики ИФБиБТ СФУ, Лаборатории биолюминесцентных биотехнологий СФУ, Института биофизики СО РАН и Лаборатории Структурной биологии/ Биоинформатики Университета г. Байройт (Германия).

Работа была отмечена следующими наградами: лучший стендовый доклад школы молодых ученых «Биоинформатика и системная биология» (Новосибирск, 2012), диплом I степени на конкурсе научно-популярных статей в рамках конференции «Биология - наука XXI века» (Пущино, 2015), государственная премия Красноярского Края в области профессионального образования за высокие результаты в педагогической деятельности и научных разработках, направленных на социально-экономическое развитие края (распоряжение Губернатора Красноярского края от 06.11.2015 г. № 608-рг).

Диссертационная работа была выполнена в рамках Государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на оказание услуг (выполнение работ) в 2017 году, проект № 6.7734.2017/БЧ «Роль макромолекулярного краудинга в регуляции эффективности сопряжения ферментов метаболических путей светящихся бактерий», при поддержке РФФИ, грант № 16-34-00746 мол_а, № 18-44-243009 р_мол_а и КГАУ «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» в рамках соглашения №7 от 06.08.2009 и дополнительного соглашения №48/15 от 19.06.2015.

Личный вклад. Представленные в работе результаты были получены либо автором самостоятельно, либо при его непосредственном участии. Автор принимал участие во всех этапах исследования: от постановки цели и задач, выбора методов, проведения расчетов с последующим анализом, обобщением и интерпретацией результатов, подготовкой и оформлением публикаций.

Диссертация соответствует паспорту специальности **03.01.02 – биофизика**. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследований специальности, пункт 1 — молекулярная биофизика.

Достоверность подтверждена достаточным объемом данных, их воспроизводимостью, а также использованием современных методов исследования и статистического анализа при проведении научной работы.

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 19 печатных изданиях, в том числе: 1 статья в российском журнале и 2 статьи в международных журналах из списка ВАК РФ; 3 публикации тезисов докладов в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus; 13 — в тезисах докладов всероссийских и международных конференций.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, трех глав с результатами работы, заключения и приложений. Полный объем диссертации **158** страниц текста с **37** рисунками и **30** таблицами. Список литературы содержит **149** наименований.

Основное содержание работы

Обзор литературы

В первой главе представлен литературный обзор современного состояния проблемы, а именно: описано строение люцифераз и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз светящихся бактерий, их функциональные характеристики, приведены результаты исследований механизма взаимодействия между белками.

Согласно экспериментальным данным люциферазы светящихся бактерий можно разделить на две группы на основании таких параметров, как последовательность связывания субстратов, константа спада биолюминесцентной реакции и сродство к альдегидному фактору [Hastings *et al.*, 1963]. В первую группу входят все виды светящихся бактерий рода *Photobacterium* и *Aliivibrio*, которые имеют быструю кинетику затухания люминесценции в реакции с додеканалем (константа спада от 0,64 до 1,00 $с^{-1}$) и высокий квантовый выход в реакции с тетрадеканалем. Вторую группу составляют бактерии рода *Vibrio*, для которых характерна медленная кинетика (константа спада около 0,12 $с^{-1}$) и предпочтение деканаля в качестве субстрата [Nealson *et al.*, 1979; Valkova *et al.*, 1999]. Несмотря на то, что различия кинетических характеристик люцифераз были обнаружены достаточно давно, на данный момент хорошо изучена лишь структура «медленной» люциферазы *Vibrio harveyi* [Fisher *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 2009], в частности, особенности строения α- и β-субъединицы белка, а также активного центра. Структурные свойства «быстрых» люцифераз мало изучены. Экспериментально было обнаружено несколько аминокислотных остатков, которые могут обеспечивать различия кинетических характеристик [Valkova *et al.*, 1999; Hosseinkhani *et al.*, 2005].

NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы, способные поставлять $FMNH_2$ для биолюминесцентной реакции, условно разделяют на три группы: (i) оксидоредуктазы из семейства нитроредуктаз [Tu, 2008], (ii) флавин-зависимые оксидоредуктазы – аналоги Fre из *Escherichia coli* [Zenno & Saigo, 1994; Campbell & Baldwin, 2009], (iii) LuxG оксидоредуктазы, последовательность которых, закодирована в биолюминесцентном опероне *lux*CDABEG [Nijvipakul *et al.*, 2008]. Наиболее детально исследованы структура и свойства нитроредуктазы FRP из *Vibrio harveyi* и FRG из *Aliivibrio fischeri*. Некоторые свойства LuxG оксидоредуктазы из *Photobacterium leiognathi* были установлены сравнительно недавно [Tinikul *et al.*, 2013; Nijvipakul *et al.*, 2008].

Существует две модели, описывающие перенос $FMNH^-$ от оксидоредуктазы к люциферазе *in vivo*: (1) в результате формирования комплекса между белками, что предохраняет нестабильный $FMNH^-$ от быстрого автоокисления [Jeffers & Tu, 2001; Jeffers *et al.*, 2003; Low & Tu, 2003; Lei & Tu, 1998] и (2) перенос $FMNH^-$ за счет свободной диффузии в среде [Tinikul *et al.*, 2013; Campbell & Baldwin, 2009]. Для каждого из этих механизмов получены как подтверждающие, так и опровергающие экспериментальные данные. Таким образом, вопрос существовании комплекса между люциферазой и оксидоредуктазой, способствующего прямой передаче $FMNH^-$ без контакта с окружающей средой, остается открытым.

Материалы и методы

Вторая глава включает в себя описание методов и подходов, использованных в ходе выполнения диссертационной работы. Для анализа функциональных сайтов использовали аминокислотные последовательности люциферазы и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз из базы данных NCBI [Geer *et al.*, 2010]. Набор данных для анализа был подготовлен при помощи скриптов на языке Python (версия 2.7.12) на основании аннотации частично и полностью расшифрованных геномов 23-х видов светящихся бактерий. Для исследования эволюции оксидоредуктаз LuxG помимо анализа полногеномных последовательностей, скаффолдов и контигов проводили поиск гомологов при помощи сервиса BLAST [Altschul *et al.*, 1990]. В работе также был выполнен анализ пространственных структур белков, взятых из банка данных PDB [Berman *et al.*, 2000], и структур, смоделированных по гомологии.

Филогенетический анализ для каждого набора аминокислотных последовательностей проводили следующим образом. Сначала при помощи программы MAFFT [Nakamura *et al.*, 2018] строили множественное выравнивание. Затем определяли наиболее подходящую модель аминокислотных замен с помощью программы ProtTest версии 3.4.2 [Darriba *et al.*, 2011], после чего строили филогенетическое дерево на основании выбранной модели с помощью метода максимального правдоподобия, реализованного в программе PhyML-3.1 [Guindon & Gascuel, 2003]. Для проверки достоверности построенных деревьев использовали бутстрэп-анализ, а также Байесовский анализ в программе MrBayes v3.2.6 [Ronquist *et al.*, 2003]. Полученное в результате анализа консенсусное дерево было рассчитано при помощи программного пакета phylip-3.695, при этом положение корня определялось при помощи внешней группы. Оценку совместной эволюции исследуемых белков проводили с помощью сервера MirrorTree [Ochoa *et al.*, 2015]. Для визуализации филогенетического дерева применялся электронный ресурс iTOL [Letunic & Bork, 2016].

Определение специфичных позиций выравнивания, которые могут обеспечивать функциональную вариабельность белков внутри одного семейства, проводили при помощи программы Diverge 3.0 [Gu *et al.*, 2013]. Также функционально значимые структурные мотивы были выявлены в результате поиска консервативных остатков при помощи программного пакета Jalview [Waterhouse *et al.*, 2009] и сервера NCBI Conserved Domains [Marchler-Bauer *et al.*, 2017].

К настоящему времени расшифрована кристаллическая структура люциферазы из *V. harveyi* с разрешением 1.5 Å (PDB ID: 1LUC) и 2.4 Å (PDB ID:

1BRL) без субстратов, а также 2.3 Å (PDB ID: 3FGC) с продуктом реакции FMN. В данной работе использовали последнюю указанную структуру, так как она расшифрована наиболее полно. Также использовали кристаллические структуры двух оксидоредуктаз: NADPH:FMN-оксидоредуктазы *V. harveyi* (PDB ID: 2BKJ) и Fre оксидоредуктазы *E. coli* (PDB ID: 1QFJ).

Моделирование пространственной структуры белка по гомологии применяли для решения двух задач: 1) реконструкция нерасшифрованных элементов белковых макромолекул – с помощью программы MODELLER [Fiser & Sali, 2003]; 2) создание пространственных структур белков, которые на данный момент не расшифрованы – с помощью сервера SWISS-MODEL [Waterhouse *et al.*, 2018]. В частности, была реконструирована люцифераза *P. leiognathi* и оксидоредуктаза LuxG *V. harveyi*. Полученные структуры далее оптимизировали **методом молекулярной динамики** в программном пакете GROMACS 5.1.4. [Abraham *et al.*, 2015]. Для этого использовали силовое поле CHARMM36 [Huang & MacKerell, 2013], в котором проводили процедуру оптимизации, а затем релаксации структур (с использованием поочередно NVT и NPT ансамблей), и расчет траектории молекулярной динамики. Качество полученных моделей проверяли с помощью программы PROCHECK [Laskowski*et al.*, 2001]. Анализ расположения консервативных остатков и функционально важных доменов был сделан в программном пакете визуализации молекулярных систем VMD [Humphrey *et al.*, 1996].

Метод белок-белкового докинга использовался для установления механизма взаимодействия люциферазы и FRP оксидоредуктазы *V. harveyi*. Данный подход реализован в программе MC-Dock [Ullmann *et al.*, 1997]. Предварительно для каждого из белков рассчитывали потенциал электростатического поля, создаваемого полярными заряженными аминокислотными остатками, в программе APBS [Baker *et al.*, 2001]. Далее при помощи метода Монте-Карло производили поиск белок-белкового комплекса с наименьшей энергией электростатического взаимодействия. Конфигурации оксидоредуктазы относительно фиксированной молекулы люциферазы выбирали на основании критерия Метрополиса.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ структуры люцифераз светящихся бактерий

В главе представлены результаты анализа множественного выравнивания аминокислотных последовательностей люциферазы, эволюции данного белка и роли консервативных остатков в разбиении люцифераз на две группы:

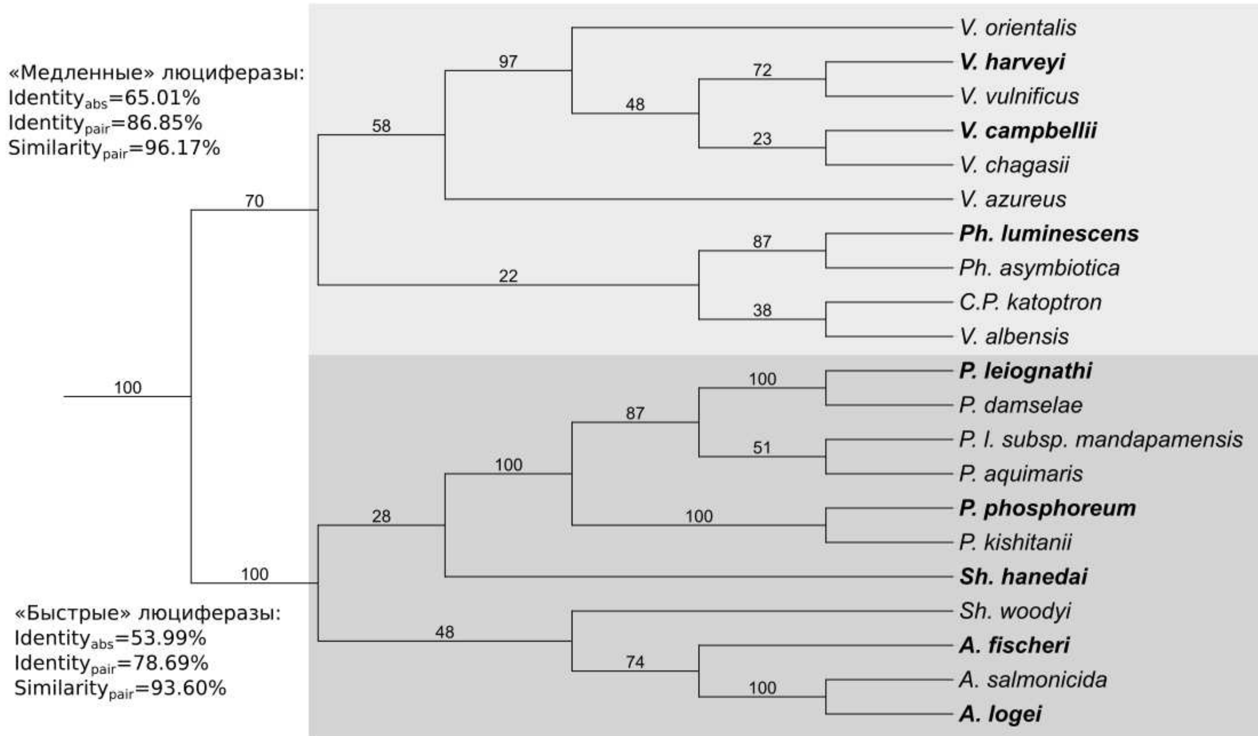

Рисунок 1: Кладограмма α-субъединицы бактериальных люцифераз. Бактерии в каждой из клад имеют схожую кинетику биолюминесцентной реакции. Названия бактерий, для которых экспериментально определён тип кинетики, выделены жирным шрифтом [Deeva *et al.*, 2016]. Для оценки достоверности полученного дерева использовался бутстрэп-анализ (число реплик – 1000)

«быстрые» и «медленные». Попарное выравнивание первичных структур α-субъединицы люциферазы показало, что она более консервативна (53–99 % абсолютно консервативных позиций, медиана – 66 %), по сравнению с β-субъединицей (43–98 %, медиана – 55 %). Результаты, полученные для 21-й последовательности α- и 21-й последовательности β-субъединицы, согласуются с ранее опубликованными данными для 6-ти видов светящихся бактерий рода *Photobacterium*, *Photorhabdus* и *Vibrio* [Meighen, 1991].

Дерево α-субъединицы представлено на Рисунке 1. Согласно данным филогенетического анализа последовательности α-субъединицы люциферазы формируют две клады, видовой состав которых согласуется с кинетическими особенностями данных ферментов. В первую кладу попали «быстрые» ферменты (бактерий рода *Photobacterium*, *Aliivibrio* и *Shewanella*), а во вторую — «медленные» (рода *Vibrio* и *Photorabdus*) [Nealson *et al.*, 1979; Valkova *et al.*, 1999]. Таким образом, было обнаружено, что кинетические особенности люцифераз однозначно задаются их первичной последовательностью. Полученные данные также указывают на то, что люцифераза малоизученных бактерий *Candidatus Photodesmus katoptron* принадлежит к «медленным» и имеет наибольшее сходство с белками из рода *Photorabdus*.

Значительный интерес представляют аминокислотные остатки, которые вносят вклад в разбиение α-субъединиц на две клады, так как именно они могут определять функциональные особенности «быстрых» и «медленных» люцифераз. Было выявлено 22 специфичные позиции выравнивания, которые различаются между двумя группами, но абсолютно консервативны для последовательностей внутри группы (пример представлен на Рисунке 2). Помимо этого было найдено 26 позиций также консервативных внутри группы, но с 1–3 исключениями. Среди 48 позиций, определяющих разделение на группы, были обнаружены аминокислотные остатки одного типа (например, у всех «быстрых» – Arg271, а у всех «медленных» – Lys271), что предположительно не меняет функциональность соответствующего структурного мотива белка. Однако также были найдены остатки, значительно различающиеся по физико-химическим свойствам (например, Ala65 в составе «медленных» ферментов и Arg65 – в составе «быстрых»). Считается, что такие позиции формируют сайты, отвечающие за специфические функции соответствующего подсемейства белков. Они обеспечивают специфику внутри групп белков одного семейства, при этом основная функция остается неизменной. Формирование специфичных сайтов, значительно различающихся по физико-химическим свойствам, происходит в результате мутации на ранних этапах эволюции белка, после чего под действием отрицательного отбора оба варианта оказываются консервативны. Такие аминокислотные остатки характеризуются функциональной дивергенцией типа II [Gu *et al.*, 2013]. Из 48 найденных позиций 25 были отнесены к данному типу эволюционной дивергенции (табл. 1).

Рисунок 2: Фрагмент множественного выравнивания аминокислотных последовательностей «быстрых» и «медленных» люцифераз. Оранжевым и зеленым шрифтом обозначены остатки, которые являются определяющими для разбиения люцифераз на две клады

На следующем этапе исследования была проанализирована структура активного центра двух типов люцифераз. Было выполнено структурное выравнивание «медленной» люциферазы *V. harveyi*, расшифрованной ранее вместе с продуктом реакции FMN, и «быстрой» люциферазы *P. leiognathi*, структура которой была получена при помощи моделирования по гомологии.

Таблица 1: Позиции множественного выравнивания, в которых аминокислотные остатки консервативны у двух типов бактериальных люцифераз. Жирным шрифтом обозначены позиции, для которых характерна функциональная дивергенция типа II (θ_{II} = 0.079 ± 0.061, Z score = 1.29)

	№ позиции выравнивания
Абсолютно консервативны	6, 8, 9, **34**, **52**, **55**, **65**, 74, **75**, **91**, **106**, 127, 131, **171**, 172, **173**, 183, 191, 233, 275, 327, 351
Консервативны не менее, чем на 70%	7, **15**, **17**, **22**, 24, **26**, **41**, **102**, 105, **119**, **123**, **128**, **132**, 134, **170**, 205, 230, 245, **252**, 271, **276**, **289**, **347**, 348, 356, **357**

Далее было проанализировано положение аминокислотых остатков активного центра, которые участвуют в разбиении люцифераз на две клады (Рисунок 3).

Во-первых, было обнаружено смещение положения фенилаланина, расположенного с *si*-стороны плоскости изоаллоксазинового кольца флавина: в шестой позиции у «медленных» люцифераз имеется фенилаланин (αPhe6), а у «быстрых» изолейцин (αIle6); в восьмой позиции, наоборот, у «медленных» люцифераз находится лейцин (αLeu8), а у «быстрых» – фенилаланин (αPhe8) (Рисунок 3, А). В обоих случаях данные остатки формируют участок активного центра, важный для связывания субстратов за счет гидрофобных и стэкинг–взаимодействий. Замена гидрофобных аминокислот на лейцин или изолейцин, которые также гидрофобны, часто встречается в гомологичных белках, что в целом не приводит к изменению полярности активного центра. Однако, обнаруженное различие может определять специфичность «быстрых» и «медленных» люцифераз к длине углеводородной цепи молекулы альдегида, так как предполагается, что αPhe6 и αSer227 формируют полость для связывания данного субстрата в структуре «медленных» люцифераз [Lorenzo *et al.*, 1989].

Во-вторых, было обнаружено важное структурное различие в расположении серосодержащих аминокислотных остатков, способных принимать участие в стабилизации производных флавина: αAla74 – у «медленных» и αMet74 – у «быстрых», αCys106 – у «медленных» и αVal106 – у «быстрых» (Рисунок 3, Б). Биолюминесцентная реакция включает в себя ряд химических превращений интермедиатов реакции в активном центре фермента [Hou *et al.*, 2014]. Ранее было показано [Abu-Soud *et al.*,1993], что αCys106 играет важную роль на стадии образования 4а-гидроперокси-флавина – одного из интермедиатов, формирующихся в результате взаимодействия $FMNH^-$ и O_2. Замена цистеинового остатка на валиновый приводит к формированию нестабильного комплекса люциферазы с 4а-гидроперокси-флавином и снижает активность фермента. Однако, двойная мутация αCys106Val и αAla75Gly способствует стабилизации данного интермедиата и позволяет получить

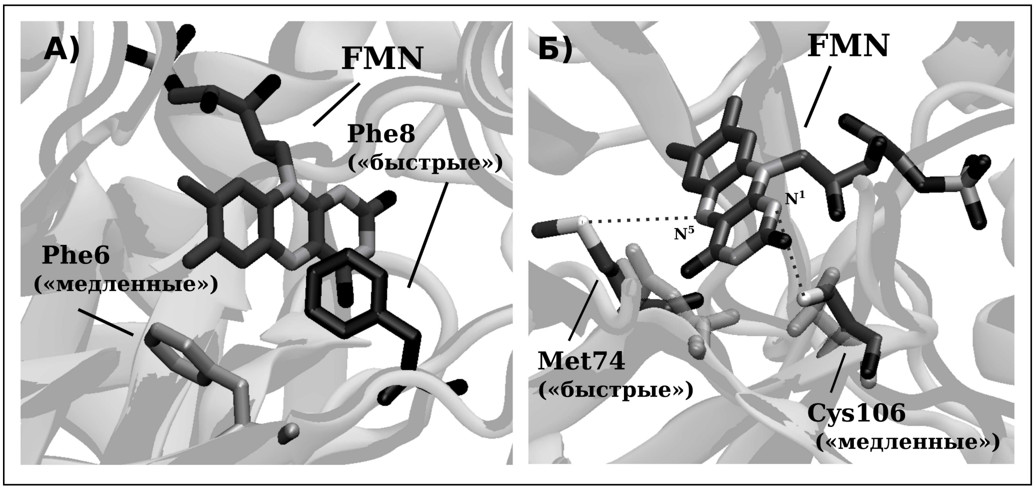

Рисунок 3: Структурное выравнивание активных центров «быстрых» (*P. leiognathi*) и «медленных» (*V. harveyi*) люцифераз. А) Сдвиг остатка фенилаланина. Б) Альтернативное взаимодействие серосодержащих аминокислотных остатков с флавином

фермент с достаточно высокой активностью [Lin *et al.*, 2002]. Эти факты хорошо согласуются с результатами данной работы, поскольку αCys106 и αAla75 принадлежат к остаткам «медленных» люцифераз, а αVal106 и αGly75 – «быстрых». Учитывая экспериментальные доказательства функциональной значимости αCys106 для катализа, можно предположить, что у «быстрых» люцифераз его функцию выполняет αMet74, а значит две группы белков обладают различающимися механизмами связывания субстратов и стабилизации интермедиатов реакции.

Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей β-субъединицы люциферазы показал, что топология её филогенетического дерева совпадает с деревом α-субъединицы. Было получено сравнительно высокое значение коэффициента корреляции между матрицами расстояния филогенетических деревьев α- и β-субъединиц, что указывает на их совместную эволюцию (табл. 2).

Таблица 2: Значение коэффициента корреляции (коэволюции) между матрицей расстояния филогенетического дерева LuxA и других белков *lux*-оперона

	LuxB	LuxC	LuxD	LuxE	LuxG
LuxA	0.941	0.858	0.896	0.841	0.839

Было установлено, что в отличие от α-субъединицы, у которой большая часть консервативных аминокислотных остатков формирует активный центр и прилегающие к нему области, у β-субъединицы более трети консервативных аминокислотных остатков (25 позиций выравнивания) расположены на участке взаимодействия двух субъединиц (α/β- интерфейс). Это подтверждает предположение о том, что основной функцией β-субъединицы является стабилизация активной конформации α-субъединицы [Campbell *et al.*, 2009].

Филогенетический анализ оксидоредуктаз

В главе представлен анализ аминокислотных последовательностей NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз разных типов, способных восстанавливать флавинмононуклеотид для биолюминесцентной реакции.

Для предсказания возможности белок-белковых взаимодействий между люциферазой и оксидоредуктазами были использованы методы биоинформатики, базирующиеся на эволюционной взаимосвязи генов функционально связанных белков. Были реконструированы филогенетические деревья для бактериальной люциферазы, LuxG, Fre, FRP и FRG светящихся бактерий. Расчет коэффициентов корреляции между матрицами расстояния филогенетических деревьев показал, что только оксидоредуктаза LuxG эволюционировала совместно с люциферазой (Таблица 3). Данный белок, хотя и закодирован в *lux*-опероне вместе с другими ферментами биолюминесцентной системы бактерий, является мало изученным как в структурном, так и функциональном плане. Его эволюцию и структурные особенности исследовали в данной работе путём сравнения с гомологичной оксидоредуктазой Fre, которая является «белком домашнего хозяйства» гамма-протеобактерий.

Таблица 3: Значение коэффициента корреляции (коэволюции) между матрицей расстояния филогенетического дерева LuxA и оксидоредуктаз светящихся бактерий. В скобках указано количество найденных аминокислотных последовательностей

	LuxG (14)	Fre (19)	FRP (13)	FRG (18)
LuxA (21)	0.839	0.209	0.468	0.135

В результате поиска гомологов LuxG *V. harveyi* и LuxG *P. leiognathi* было найдено 367 аминокислотных последовательностей Fre нелюминесцентных бактерий, 31 последовательность Fre светящихся бактерий и 33 первичных последовательности LuxG. Полученный набор данных подтверждает, что LuxG является гомологом Fre, а значит принадлежит к семейству флавинзависимых оксидоредуктаз (ферродоксин-NADP(+) оксидоредуктаз, FNR) [Zenno & Saigo, 2003]. На основании множественного выравнивания найденных белков было реконструировано филогенетическое дерево, которое схематически представлено на Рисунке 4. В кладу {1} вошли 33 последовательности LuxG светящихся бактерий и 3 последовательности оксидоредуктаз *Photobacterium piscicola*, *Vibrio lentus* и *Vibrio sp. BCB494*. Указанные виды бактерий не относятся к светящимся, но их геном содержит нефункционирующий *lux*-оперон.

Клада {1} состоит из трех основных ветвей: две группы LuxG оксидоредуктаз, соответствующие двум группам «быстрых» и «медленных» люцифераз, и ветвь LuxG из *V. albensis* и *Vibrio sp. RC586*. Полученная топология клады подтверждает, что ген *luxG* эволюционировал совместно с *luxAB* в составе оперона и мог значительно дивергировать по сравнению с Fre в результате как естественного отбора, так и нейтральных мутаций (Таблица 3).

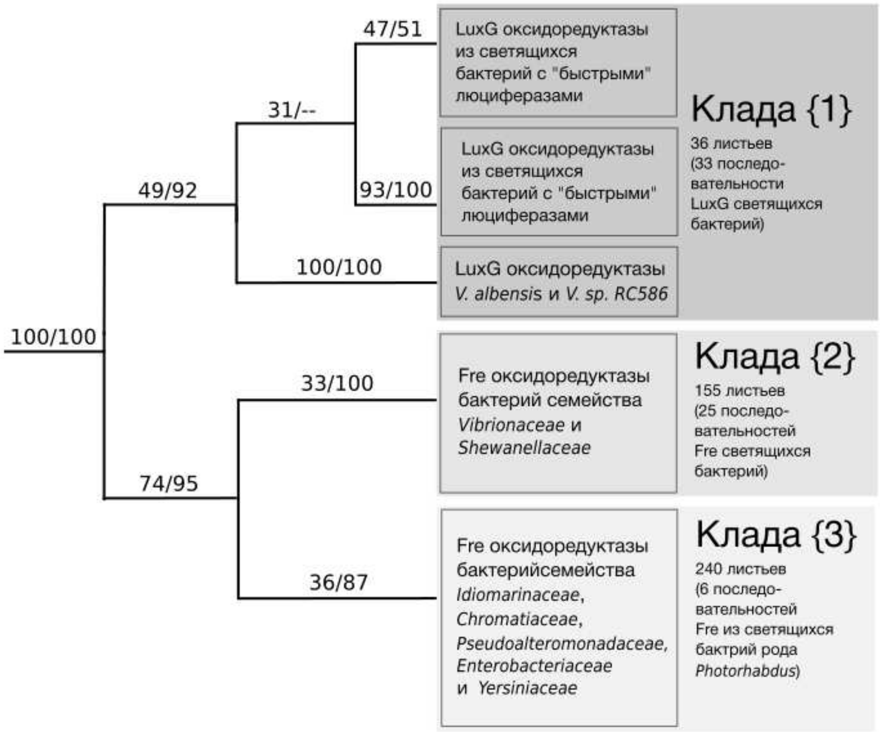

Рисунок 4: Схематическое представление кладограммы Fre и LuxG оксидоредуктаз, построенной методом ML с использованием модели LG+I+G, указаны значения бутстрэп-индексов/апостериорной вероятности в процентах.

Для анализа консервативных мотивов из набора последовательностей Fre и LuxG были отобраны оксидоредуктазы только светящихся бактерий и Fre *E. coli* (34 последовательности). Было обнаружено 28 абсолютно консервативных позиций выравнивания, 10 – консервативных $\geq$ на 97%, и 9 – на $\geq$ 94% (всего 47 позиций). Также было найдено 22 позиции, которые консервативны только у Fre оксидоредуктаз, в то время как в первичной структуре LuxG данные сайты оказались вариабельны. Изменения такого рода происходят в результате функциональной дивергенции внутри семейства белков, когда ферменты в составе подсемейства начинают выполнять схожие функции, но в другом метаболическом пути. Так и в случае LuxG и Fre оксидоредуктаз можно выделить специфичные позиции выравнивания, соответствующие функциональным сайтам, которые значительно дивергировали в результате совместной эволюции LuxG с белками *lux*-оперона (табл. 4). Структурное выравнивание *V. harveyi* LuxG, *E. coli* Fre и оксидоредуктазы шпината *Spinacia oleracea*, расшифрованной с FAD и 2’-фосфо-5’-AMP, позволило сопоставить положение ключевых аминокислотных остатков (Рисунок 5).

Таблица 4: Значения коэффициентов функциональной дивергенции типа I и типа II, полученные при анализе филогенетического дерева реконструированного на основании 34 последовательностей LuxG и Fre светящихся бактерий и *E. coli*: LuxG (Кластер 1), Fre (Кластер 2), Fre светящихся бактерий (Кластер 2.1), Fre *Photorhabdus* и *E.coli* (Кластер 2.2). Позиции выравнивания, соответствующие одному из типов функциональной дивергенции, определялись на основании рассчитанного значения апостериорной вероятности (P $\geq$ 0,75). Используемая нумерация аминокислотных остатков соответствует позициям в последовательности оксидоредуктазы Fre *E. coli*.

Кластеры белков	Коэфициент функциональной дивергенции (Z-score)	Функционально важные сайты, для которых значение апостериорной вероятности составило P $\geq$ 0.75
Кластер 1 *vs* Кластер 2	θ_I = 0.147 ± 0.059 (2.82) θ_{II} = –0.274 ± 0.225 (1.09)	45, 46, 134, 186, 195, 203, 232 Нет
Кластер 1 *vs* Кластер 2.1	θ_I = 0.217 ± 0.066 (3.84) θ_{II} = –0.196 ± 0.207 (0.95)	46, 134, 151, 186, 195, 203, 232 67, 202
Кластер 1 *vs* Кластер 2.2	θ_I = 0.279 ± 0.095 (3.25) θ_{II} = –0.241 ± 0.163 (1.48)	195 Нет

Дивергенцией типа I характеризуются функциональные сайты белков одного семейства, значительно различающиеся по скорости эволюции [Gu *et al.*, 2013]. Так, в одном подсемействе специфичная позиция является консервативной, в то время как для другого подсемейства характерна значительная вариабельность в данной позиции. Arg46 относится к данному типу дивергенции. Данный остаток входит в состав функционального участка Arg46-Pro47-Phe48-Ser49 (RPFS), который является консервативным у всех Fre оксидоредуктаз (Рисунок 5, A). В данной позиции выравнивания у всех LuxG находится неконсервативный остаток. Поскольку в структуре Fre консервативный участок RPFS расположен в сайте связывания флавина, то полученные структурные особенности должны отразиться на специфичности LuxG по отношению к этому субстрату. Действительно, показано, что в то время как Fre обладает большей аффинностью к FAD, чем к FMN (разница констант диссоциации на три порядка) [Louie *et al.*, 2002], LuxG может катализировать восстановление FMN, FAD и рибофлавина с одинаковой эффективностью [Nijvipakul *et al.*, 2008]. Вероятно, обсуждаемый консервативный участок играет важную роль во взаимодействии с фосфатной группой флавина.

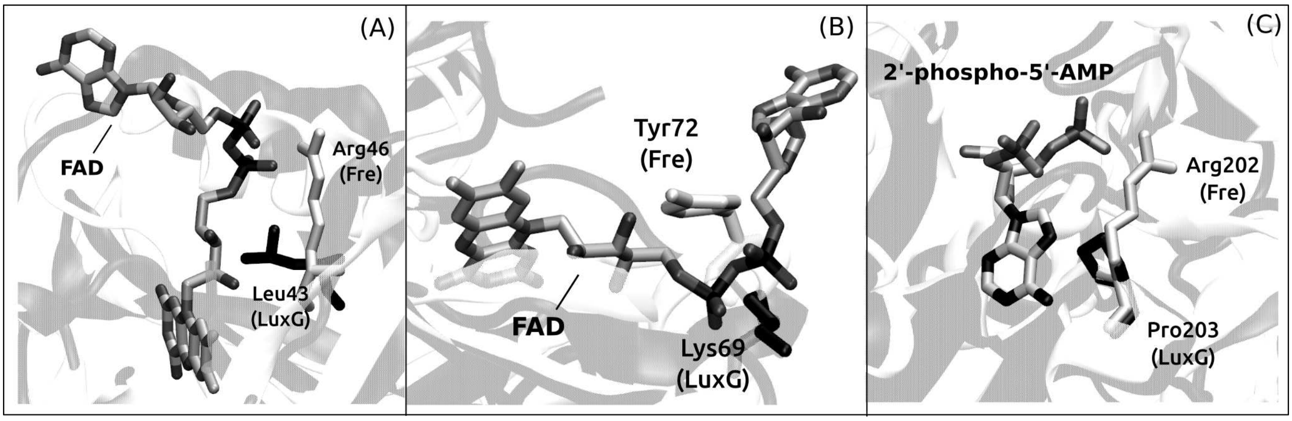

Рисунок 5: Структурное выравнивание активных центров *E. coli* Fre и *V. harveyi* LuxG. Функциональные сайты Fre показаны при помощи палочковой модели и представлены серым цветом, соответствующие остатки LuxG представлены черным цветом. Координаты FAD и 2'-фосфо-5'-AMP взяты из структуры FNR *Spinacia oleracea*. (A) и (B) — различия в связывании фосфатной группы; (C) — особенности взаимодействия с аденином, характерные для LuxG и Fre.

Мобильная петля между 63 и 68 остатками (позиции 67–72 в структуре Fre *E. coli*) также оказалась менее консервативна у LuxG оксидоредуктаз. В частности, остатки Asn70 и Tyr72 консервативны у Fre, в то время как у LuxG встречаются различные полярные аминокислотные остатки в данной позиции (Рисунок 5, B). Известно, что у белков семейства ферродоксин-NADP(+) оксидоредуктаз (FNR) данная мобильная петля участвует в связывании функциональной группы аденозиндифосфата в составе FAD, который является кофактором данных ферментов [Ingelman *et al.*, 1999]. Укороченная петля LuxG и Fre оксидоредуктаз может выполнять схожие функции, но с меньшей эффективностью, так как FAD является для данных ферментов субстратом, поэтому не требует прочного связывания. Таким образом, вариабельность аминокислотного состава мобильной петли LuxG оксидоредуктаз согласуется с данными о том, что LuxG обладает меньшей аффинностью к FAD по сравнению с Fre оксидоредуктазой.

Функциональная дивергенция типа II характерна для сайтов, в которых произошла мутация на ранних этапах эволюции, что привело к появлению аминокислотных остатков, значительно различающихся по физико-химическим свойствам и консервативных у белков одного подсемейства. Такой тип дивергенции был найден между последовательностями LuxG (Кластер 1) и Fre светящихся бактерий (Кластер 2.1), так как с учетом стандартного отклонения коэффициент θ_{II} может принимать значения $0 < \theta_{II} \leq 1$. Позиция 202 LuxG и Fre оксидоредуктаз характеризуется дивергеницей типа II (Таблица 4). Данный остаток формирует сайт связывания молекулы NAD(P)H. При этом в позиции 202 у всех Fre находится аргинин, в то время как у всех LuxG в соответствующей позиции – консервативный пролин (Рисунок 5, С). Это указывает на то, что Fre и LuxG оксидоредуктазы могут по-разному связывать NAD(P)H в активном центре.

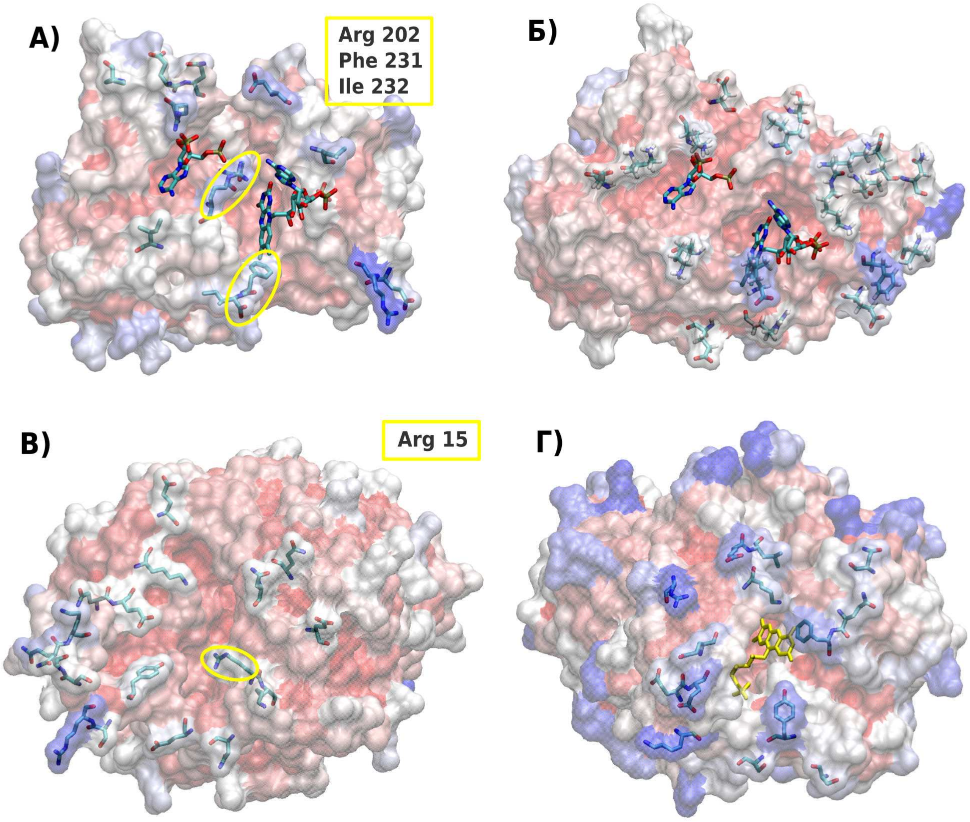

Рисунок 6: Фрагмент поверхности доступной растворителю в области активного центра А) оксидоредуктазы Fre *E. coli*, Б) LuxG *V. harveyi*, В) оксидоредуктазы FRP *V. harveyi* и Г) оксидоредуктазы FRG *A. fischeri*. Синим цветом на поверхности изображены области, в которых находятся гидрофильные остатки, красным – гидрофобные области. С помощью «палочковой» модели изображены субстраты, а также остатки, для которых параметр SASA > 95 Å^2. Желтым цветом обведены консервативные остатки для соответствующей групп белков (номера позиций указаны в рамке)

К функциональным сайтам белков относятся не только аминокислотные остатки активного центра или сайты связывания коферментов, но и участки, которые задействованы в белок-белковых взаимодействиях. Как и остатки активного центра, такие специфические последовательности или структурные мотивы зачастую консервативны для всех белков семейства, которые взаимодействуют с определенным белком при выполнении заданной функции [Shoemaker & Panchenko, 2007].

Анализ консервативных аминокислотных остатков LuxG, Fre, FRP и FRG оксидоредуктаз показал, что основная часть таких остатков группируется в области активного центра. Некоторые из них могут быть расположены на поверхности около входа в активный центр белка, как в случае Fre

(Рисунок 6, А), так и отсутствовать в указанной области, что было обнаружено у оксидоредуктаз LuxG, FRP и FRG (Рисунок 6, Б, В и Г).

Вклад электростатических взаимодействий в формирование комплекса между бактериальной люциферазой и NADPH:FMN оксидоредуктазой (FRP)

К настоящему моменту экспериментальными методами наиболее детально изучено взаимодействие бактериальной люциферазы и NADPH:FMN-оксидоредуктазы (FRP) *V. harveyi*. По увеличению анизотропии флуоресценции метки, прикреплённой к оксидоредуктазе, было показано образование комплекса с люциферазой с константой диссоциации 7 μM [Jeffers *et al.*, 2003]. Ряд других экспериментов также говорит о взаимодействии между белками [Jeffers & Tu, 2001; Low & Tu, 2003]. Известно, что электростатические взаимодействия играют важную роль в биологических системах, поэтому в следующей части работы был исследован вклад данного механизма в формирование комплекса между люциферазой и оксидоредуктазой FRP.

Был использован метод жесткого белок-белкового докинга [Ullmann *et al.*, 1997]. Поскольку данный метод не учитывает конформационную подвижность белков, было рассмотрено два случая: взаимодействие между ферментами при наличии мобильных петель в области активного центра и без них (с «открытыми» активными центрами). Известно, что мобильная петля люциферазы, состоящая из консервативных аминокислотных остатков (262–290 а.о.), отвечает за защиту возбужденного интермедиата реакции от возможного тушения растворителем [Sparks & Baldwin, 2001] и фиксирует субстраты в активном центре [Campbell *et al.*, 2010]. Мобильная петля FRP (201–209 а.о.) также фиксирует субстраты в активном центре [Wang *et al.*, 2000]. С одной стороны, мобильные петли являются функционально важными элементами структуры исследованных белков. С другой стороны, считается, что высоко подвижные, неупорядоченные участки белков не могут быть структурной основой для формирования стабильных межбелковых комплексов за счет электростатических взаимодействий.

Комплекс с наименьшей энергией взаимодействия (–15.7 ккал/моль), полученный в ходе докинга люциферазы и NADPH:FMN-оксидоредуктазы при наличии мобильных петель, представлен на Рисунке 7. Ориентация белков предполагает возможность прямого переноса $FMNH^{-}$, но более внимательное рассмотрение полученной структуры указывает на то, что альтернативные конформации мобильных петель могут повлиять на ориентацию белков, поскольку они содержат полярные аминокислотные остатки.

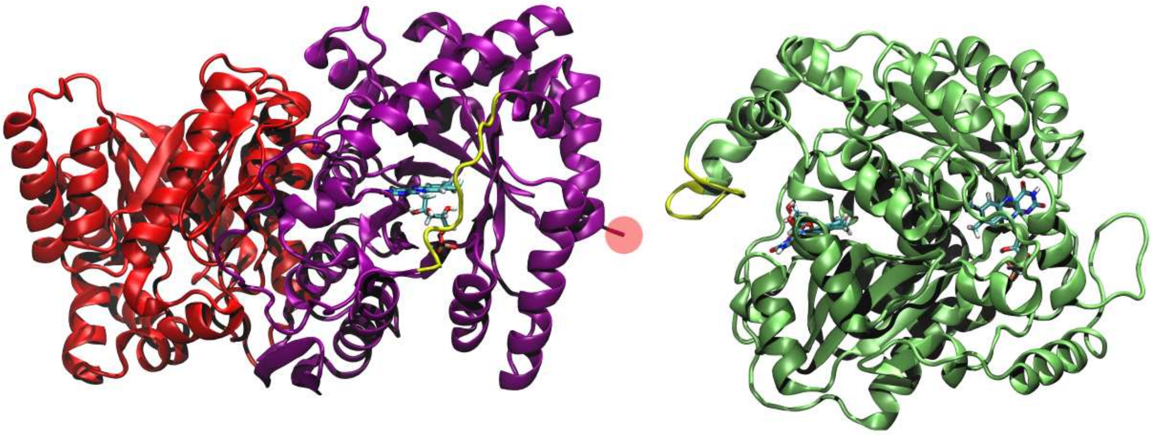

Рисунок 7: Комплекс люциферазы (слева) и оксидоредуктазы (справа), полученный в результате докинга. α-субъединица люциферазы обозначена фиолетовым, а β-субъединица – красным цветом. Молекулы флавина в активных центрах обоих ферментов представлены при помощи «палочковой» модели, цветами показаны элементы. Красным кругом обозначен C-конец. Мобильные петли обоих ферментов выделены желтым цветом.

На следующем шаге вычислений были исследованы структуры люциферазы и оксидоредуктазы с «открытым» активным центром. Траектория вычислений содержала набор конфигураций белок-белкового комплекса, каждой из которых соответствует определенное значение энергии взаимодействия. В ходе расчетов траектория поиска сужалась до определенной области, в которой расположен минимум электростатической энергии взаимодействия. На Рисунке 8 (а) синими точками представлены найденные возможные позиции оксидоредуктазы относительно люциферазы с различными значениями энергии, при этом каждая из позиций была получена не менее 15-ти раз в ходе 100 запусков симуляции. Из рисунка видно, что существует несколько областей с повышенной вероятностью нахождения оксидоредуктазы относительно люциферазы и однозначно предпочтительная конфигурация комплекса не определяется.

Однако, среди десяти структур, соответствующих наименьшим значениям энергии взаимодействия (от –14,0 до –9,4 ккал/моль), была найдена конфигурация, для которой возможен прямой перенос флавина между активными центрами ферментов без значительного контакта с растворителем (Рисунок 8 (б)). Полученный комплекс характеризуется энергией электростатического взаимодействия –9,6 ккал/моль, и наибольший вклад в его формирование вносят αArg291 и Gln197 люциферазы и оксидоредуктазы, соответственно.

Таким образом, проведенные расчеты электростатического потенциала, создаваемого бактериальной люциферазой, и оценка его влияния на взаимодействие с NADPH:FMN-оксидоредуктазой *V. harveyi* показали, что

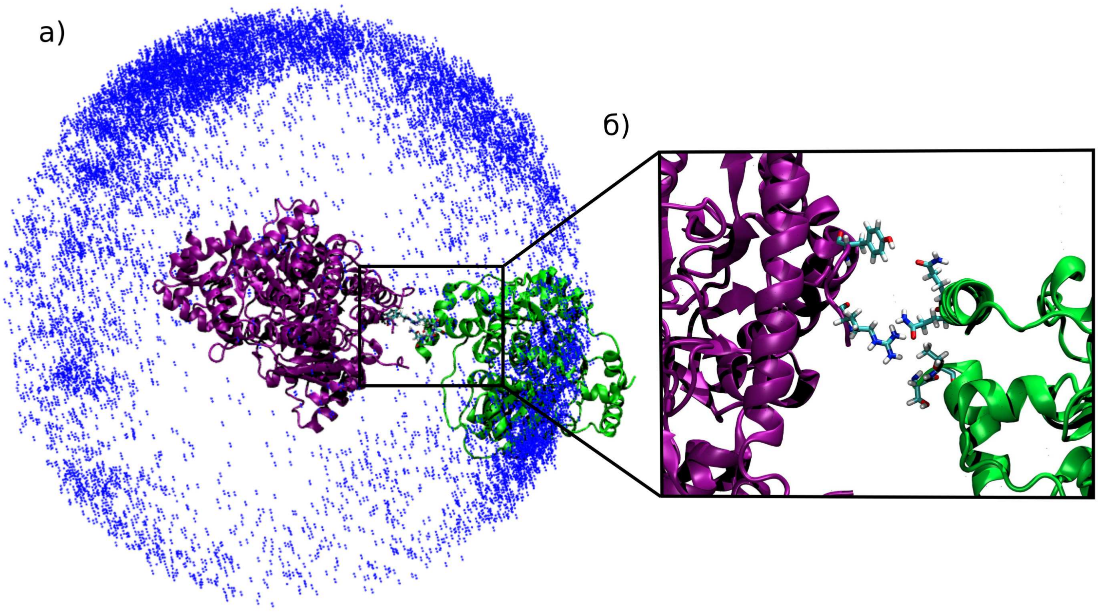

Рисунок 8: (а) Позиции оксидоредуктазы относительно люциферазы (синие точки), полученные не менее 15-ти раз в ходе 100 симуляций. Точка отражает положение центра масс белка. (б) Конфигурация комплекса с энергией взаимодействия –9.6 ккал/моль, для которой возможна прямая передача $FMNH^-$ между активными центрами ферментов. Оксидоредуктаза обозначена зеленым цветом, люцифераза – фиолетовым. Аминокислотные остатки, которые могут принимать участие в стабилизации комплекса, представлены при помощи «палочковой» модели.

вклад электростатических сил в образование комплекса между этими белками, вероятней всего, не является определяющим. Можно предположить, что отсутствие сильного комплекса согласуется с безрезультатными попытками его экспериментального выделения методами перекрестной сшивки *in vivo* и *in vitro*, аналитического ультрацентрифугирования и методом аффинной адсорбции [Campbell & Baldwin, 2009].

Выводы

1. Первичные последовательности бактериальных люцифераз формируют две клады, что согласуется с кинетическими особенностями данных ферментов. Значительная часть аминокислотных остатков, которые вносят вклад в разделение на группы, формирует активный центр фермента.

2. Консервативные аминокислотные остатки активного центра, αMet74, αGly75, αVal106, у «быстрых» люцифераз и αAla74, αAla75, αCys106 у «медленных», обеспечивают альтернативные механизмы связывания субстратов и стабилизации интермедиатов биолюминесцентной реакции.

3. Оксидоредуктазы Fre и LuxG светящихся бактерий произошли в результате дупликации гена, кодирующего общего предка. В процессе

эволюции в составе *lux*-оперона сайты связывания субстратов LuxG оказались более вариабельны по сравнению с Fre, что обусловлено необходимостью восстановления флавинмононуклеотида для биолюминесцентной реакции.

4. Поверхность оксидоредуктазы LuxG не содержит консервативных аминокислотных остатков, потенциально участвующих во взаимодействии с люциферазой для прямой передачи восстановленного флавинмононуклеотида, несмотря на совместную эволюцию LuxG и люциферазы.

5. Моделирование взаимодействия бактериальной люциферазы и NADPH:FMN-оксидоредуктазы с учетом электростатического потенциала ферментов показало, что существует несколько возможных конфигураций комплекса. В образовании белок-белкового комплекса с переносом флавина между активными центрами ферментов может играть роль взаимодействие αArg291 и Gln197 люциферазы и оксидоредуктазы, соответственно.

Публикации по теме диссертации

В журналах из списка ВАК

1. ***Deeva A.A.***, *Temlyakova E.A., Sorokin A.A., Nemtseva E.V., Kratasyuk V.A.* Structural distinctions of fast and slow bacterial luciferases revealed by phylogenetic analysis // *Bioinformatics*. — 2016. — Vol. 32, № 20. — P. 3053 – 3057.

2. *Esimbekova E.N., Asanova A.A.,* ***Deeva A.A.***, *Kratasyuk V.A.* Inhibition effect of food preservatives on endoproteinases // *Food Chemistry*. — 2017. — Vol. 235. — P. 294 – 297.

3. ***Деева А.А.***, *Немцева Е.В., Кратасюк В.А.* Роль электростатических взаимодействий в формировании комплекса между бактериальной люциферазой и NADPH:FMN оксидоредуктазой // *Журнал СФУ. Биология*. — 2018. — Т. 11, № 1. — С. 16 – 29.

В тезисах докладов

4. ***Koval (Deeva) A.A.***, *Nemtseva E.V.* Structural parameters of tryptophan environment in *Photobacterium leiognathi* luciferase // Abstracts of young scientists school “Bioinformatics and systems biology” — 2012. — P. 18.

5. ***Коваль А.А.***, *Немцева Е.В., Кратасюк В.А., Улльманн М.Г.* Молекулярное моделирование взаимодействия бактериальной люциферазы и NADPH:FMN-оксидоредуктазы // Тезисы докладов IX Всероссийской научно-технической конференции с международным участием “Молодежь и наука”. Сибирский федеральный университет, г. Красноярск. — 2013. — URL:http://elib.sfu-kras.ru/handle/2311/11198.

6. ***Koval (Deeva) A.A.***, *Nemtseva E.V., Ullmann M.G.* Docking of bacterial luciferase and NADPH:FMN-oxidoreductase using continuum electrostatic method // *FEBS Journal*. — 2013. — Vol. 280, № suppl. 1. — P. 549.

7. ***Deeva A.A.***, *Nemtseva E.V., Kratasyuk V.A.* Structural properties of tryptophan microenvironment in bacterial luciferase // *Luminescence. Special Issue*. — 2014. — Vol. 29, — P. 72 – 73.

8. ***Deeva A.A.***, *Nemtseva E.V., Kratasyuk V.A.* Spectral characteristics of tryptophan in water and *Vibrio harveyi* luciferase // Abstracts of the Ninth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and StructureSystems Biology (Novosibirsk, Russia, June 23–28, 2014) — 2014. — P. 37.

9. *Темлякова Е.А., **Деева А.А.**, Немцева Е.В., Кратасюк В.А.* Сравнительный анализ активных центров «медленных» и «быстрых» люцифераз светящихся бактерий // Двадцать вторая международная конференция. Математика. Компьютер. Образование. «Анализ сложных биологическких систем. Эксперимент и модели». Тезисы. Выпуск 22., Под ред. Г.Ю. Ризниченко и А.Б. Рубина, R&C Dynamics, Москва, Ижевск. — 2015. — С. 52.

10. ***Deeva A.A.**, Temlyakova E.A., Nemtseva E.V., Sorokin A.A, Kratasyuk V.A.* Differences of the Active Site Structure as Revealed by Sequence Analysis of Slow and Fast Bacterial Luciferases // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics..* — 2015. — Vol. 33, — P. 115 — 116.

11. ***Деева А.А.**, Темлякова Е.А., Сорокин А.А., Немцева Е.В., Кратасюк В.А.* О возможности существования комплекса между люциферазами и флавин-зависимыми оксидоредуктазами светящихся бактерий и *E. coli* // Материалы VIII Московского Международного Конгресса «Биотехнология: Состояние И Перспективы Развития» 17 – 20 марта 2015 г. М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. — 2015. — С. 272.

12. ***Деева А.А.**, Темлякова Е.А., Немцева Е.В., Кратасюк В.А.* Структурный анализ флавин-зависимых оксидоредуктаз светящихся бактерий и *E.coli* – возможность формирования комплекса с люциферазой // Биология – Наука XXI века: 19-ая Международная Пущинская школа–конференция молодых ученых (Пущино, 20-24 апреля 2015 г.). Сборник тезисов. Пущино. — 2015. — С. 90 — 91.

13. ***Деева А.А.**, Суковатый Л.А., Темлякова Е.А., Немцева Е.В., Кратасюк В.А.* Сравнительный анализ жесткости активного центра бактриальной люциферазы и ее аналогов с помощью молекулярно-динамического и биоинформатического подходов // V съезд биофизиков России. Материалы докладов: в 2 т. - Ростов-на-Дону: Издательство Южного Федерального Университета. — 2015 г. — С. 392.

14. ***Deeva A.A.**, Temlyakova E.A., Nemtseva E.V., Kratasyuk V.A.* Flavin binding modes specific for fast and slow bacterial luciferases // Abstracts of the 19th International Symposium on Bioluminescence and chemiluminescence, 2016. A3-10.

15. ***Deeva A.A.**, Temlyakova E.A., Nemtseva E.V., Kratasyuk V.A.* Structural patterns among the diversity of flavin–dependent oxidoreductases from luminous bacteria and *E.coli* // The Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology. Abstracts. — 2016. — P. 66.

16. *Кобец В.А., **Деева А.А.**, Немцева Е.В.* Экспериментальная регистрация комплекса бактериальной люциферазы и NAD(P)H:FMN – оксидоредуктазы: разработка метода // Сборник материалов международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Проспект Свободный - 2016», посвященной Году образования в Содружестве Независимых Государств, Биофизика, 2016 г. — С. 14.

17. ***Деева А.А.**, Зыкова Е.А., Немцева Е.В., Кратасюк В.А.* Структурные сходства оксидоредуктаз FRE и LuxG биолюминесцентных бактерий и *E. coli* // Двадцать четвертая международная конференция. Математика. Компьютер. Образование. «Биофизика сложных систем. Молекулярное моделирование. Системная биология. Процессы самоорганизации». Тезисы. Выпуск 24., Под ред. Г.Ю. Ризниченко и А.Б. Рубина, R&C Dynamics, Москва, Ижевск. — 2017. — С. 102.

18. ***Deeva A.A.**, Zykova E.A., Nemtseva E.V., Kratasyuk V.A.* Evolutionary relatedness and electrostatic properties of NAD(P)H:FMN-oxidoreductases from luminous bacteria in the context of bioluminescence regulation // The Ninth International Young Scientists School “Systems Biology and Bioinformatics”. Abstracts. ICG SB RAS. Novosibirsk. — 2017. — P. 22.

19. ***Deeva A.A.**, Zykova E.A., Nemtseva E.V., Kratasyuk V.A.* Lux operon conservation patterns reveal specific structural properties relevant to functioning of the bacterial bioluminescent system // Abstracts of the 20th International Symposium on Bioluminescence and chemiluminescence. — 2018. URL: https://isbc-2018.sciencesconf.org/resource/page/id/24.